



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TALYTA NALDESKA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS DO EXTRATO SALINO E
LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* RADDI SOBRE
*Staphylococcus***

RECIFE

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TALYTA NALDESKA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS DO EXTRATO SALINO E
LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* RADDI SOBRE
*Staphylococcus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Coorientadora: Dr^a. Pollyanna Michelle da Silva

RECIFE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a Silva, Talyta Naldeska da
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS DO EXTRATO SALINO E LECTINA DE FOLHAS DE Schinus terebinthifolia RADDI SOBRE Staphylococcus / Talyta Naldeska da Silva. - 2022.
79 f. : il.
- Orientador: Emmanuel Viana Pontual.
Coorientadora: Pollyanna Michelle da Silva.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2023.
1. Aroeira-da-praia. 2. Staphylococcus. 3. mastite. 4. microrganismo resistente. 5. extrato vegetal. I. Pontual, Emmanuel Viana, orient. II. Silva, Pollyanna Michelle da, coorient. III. Título

CDD 636.089

TALYTA NALDESKA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS DO EXTRATO SALINO E
LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* RADDI SOBRE
*Staphylococcus***

Comissão Avaliadora:

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Titular Externo: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco

Titular Externo: Dr^a. Nataly Diniz de Lima Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Titular Externo: Prof^a. Dr^a. Lidianne Pereira de Albuquerque
Universidade Federal do Piauí

RECIFE

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por seu infinito amor e cuidado, principalmente nos últimos dois anos em que vivemos um cenário incomum de pandemia. Sem Ele seria impossível chegar até aqui e concluir este ciclo. Porque Dele, e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente (Romanos 11:36).

Aos meus pais, José Antonio e Maria de Fátima, assim como ao meu irmão Tallys, por serem meus maiores incentivadores e por impulsionarem meus sonhos.

Aos meus amigos pelo apoio e por tantos momentos felizes que compartilhamos.

Aos meus professores orientadores Emmanuel e Pollyanna por todo o conhecimento compartilhado e ajuda indispensáveis, a vocês meu respeito e admiração. Que Deus vos abençoe muitíssimo!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco por me acolher desde a graduação e se tornar a minha casa de aprendizado.

À todos que fazem o Laboratório de Bioquímica de Proteínas (Bioprot), em especial a Gustavo e aos coordenadores, o professor Thiago Napoleão e a professora Patrícia Paiva.

Aos integrantes do Laboratório de Biofísica Teórico-Computacional (LABTEC), em especial a Welton e Lucas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pela oportunidade e suporte. Aos coordenadores, secretários, professores e alunos, meus sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora por terem atendido ao nosso convite e por todas as considerações feitas.

À CAPES pela bolsa concedida durante todo o período de desenvolvimento desta dissertação.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são consideradas patógenos importantes para a medicina humana e veterinária. A formação de biofilme por estes isolados é um fator de virulência que dificulta o tratamento de infecções estimulando a busca por estratégias de controle alternativas. O extrato salino de folhas de *Schinus terebinthifolia* (ES) e a lectina isolada a partir dele (SteLL) têm ação antimicrobiana previamente relatada. Os objetivos desta dissertação foram: 1. Realizar uma revisão narrativa sobre a ação de compostos de origem vegetal contra agentes causadores de mastite; 2. Investigar o efeito de ES sobre cepas de *Staphylococcus* isoladas de mastite caprina e 3. Avaliar o potencial antibacteriano de SteLL contra isolados de *S. aureus* sensível (UFPEDA 02) e resistente à oxacilina (UFPEDA 670). Estudos previamente publicados foram acessados nas principais bases de dados e um artigo de revisão foi construído, considerando os principais mecanismos de ação antimicrobiana dos compostos vegetais. Folhas de *S. terebinthifolia* foram homogeneizadas em NaCl 0,15M para obtenção de ES e SteLL foi isolada por cromatografia em coluna de quitina. O efeito de ES sobre o crescimento e sobrevivência de cepas isoladas de mastite de *S. aureus* (Sa24, Sa32) ou *Staphylococcus* sp. (Ssp1 e Ssp2) foi avaliado através da determinação das concentrações mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB). Em seguida, a curva de crescimento dos isolados foi determinada. A atividade antibiofilme de ES foi investigada pelo método do cristal violeta. O potencial sinérgico de ES com os antibióticos carbapenema e cefalexina foi também avaliado. Adicionalmente, a CMI e CMB de SteLL frente UFPEDA 02 e UFPEDA 670 foram determinadas e a viabilidade das células bacterianas foi investigada por citometria de fluxo. O potencial antibiofilme de SteLL foi também avaliado. A revisão revelou que a toxicidade dos antimicrobianos vegetais para causadores de mastite pode envolver principalmente danos à parede celular, peroxidação lipídica, alteração do potencial transmembrana, estresse oxidativo, formação de poros de membrana e alterações morfométricas que levam à apoptose ou aumento na permeabilidade celular. A atividade antibiofilme pode resultar da inibição da adesão dos microrganismos, interferência nos sinais autoindutores de quorum sensing e/ou degradação da matriz exopolimérica. ES inibiu o crescimento de Sa24, Sa32, Ssp1 e SSp2 (CMI de 1800, 900, 450 e 225 µg/mL, respectivamente) mas não interferiu na sobrevivência dos isolados. A formação de biofilmes por todos os isolados foi prejudicada por ES. Além disso, o ES também exerceu ação sinérgica em combinação com os antibióticos contra todos os isolados. SteLL foi agente bacteriostático e bactericida para UFPEDA 02 e UFPEDA 670 com CMI de 12,5 e 25 µg/mL e CMB de 50 e 100 µg/mL, respectivamente. SteLL inibiu o crescimento de forma dose-dependente e alterou parâmetros morfométricos relacionados ao tamanho, forma e complexidade celular das cepas sensível e resistente, bem como inibiu a formação de biofilme. Em conclusão, ES é um agente antimicrobiano por afetar o crescimento e a formação de biofilmes por isolados de mastite, e a toxicidade de SteLL para *S. aureus* envolve a inibição do crescimento, indução de morte celular e inibição da formação de biofilmes.

Palavras-chave: Aroeira-da-praia, *Staphylococcus aureus*, mastite, microrganismo resistente, extrato vegetal, lectina.

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Staphylococcus* are considered important pathogens for human and veterinary medicine. The formation of biofilm by these isolates is a virulence factor that hinders the treatment of infections, stimulating the search for alternative control strategies. The saline extract of leaves of *Schinus terebinthifolia* (ES) and the lectin isolated from it (SteLL) have previously reported antimicrobial action. The objectives of this dissertation were: 1. Carry out a narrative review on the action of compounds of plant origin against agents that cause mastitis; 2. To investigate the effect of ES on strains of *Staphylococcus* isolated from caprine mastitis and 3. To evaluate the antibacterial potential of SteLL against isolates of *S. aureus* sensitive (UFPEDA 02) and resistant to oxacillin (UFPEDA 670). Previously published studies were accessed in the main databases and a review article was constructed, considering the main mechanisms of antimicrobial action of plant compounds. *S. terebinthifolia* leaves were homogenized in 0.15M NaCl to obtain ES and SteLL was isolated by chitin column chromatography. The effect of ES on the growth and survival of mastitis strains isolated from *S. aureus* (Sa24, Sa32) or *Staphylococcus* sp. (Ssp1 and Ssp2) was evaluated by determining the minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations. Then, the growth curve of the isolates was determined. The antibiofilm activity of ES was investigated by the crystal violet method. The synergistic potential of ES with carbapenem and cephalexin antibiotics was also evaluated. Additionally, the MIC and MIC of SteLL against UFPEDA 02 and UFPEDA 670 were determined and the viability of bacterial cells was investigated by flow cytometry. The antibiofilm potential of SteLL was also evaluated. The review revealed that the toxicity of plant antimicrobials for causing mastitis may mainly involve damage to the cell wall, lipid peroxidation, alteration of transmembrane potential, oxidative stress, formation of membrane pores and morphometric changes that lead to apoptosis or increase in cell permeability. Antibiofilm activity may result from inhibition of adhesion of microorganisms, interference with autoinductive quorum sensing signals and/or degradation of the exopolymeric matrix. ES inhibited the growth of Sa24, Sa32, Ssp1 and SSp2 (CMI of 1800, 900, 450 and 225 µg/mL, respectively) but did not interfere with the survival of the isolates. Biofilm formation by all isolates was impaired by ES. In addition, ES also exerted a synergistic action in combination with antibiotics against all isolates. SteLL was a bacteriostatic and bactericidal agent for UFPEDA 02 and UFPEDA 670 with CMI of 12.5 and 25 µg/mL and CMB of 50 and 100 µg/mL, respectively. SteLL inhibited growth in a dose-dependent manner and altered morphometric parameters related to cell size, shape and complexity of sensitive and resistant strains, as well as inhibiting biofilm formation. In conclusion, ES is an antimicrobial agent as it affects growth and biofilm formation by mastitis isolates, and the toxicity of SteLL to *S. aureus* involves inhibition of growth, induction of cell death and inhibition of biofilm formation.

Key-words: Brazilian pepper tree, *Staphylococcus aureus*, mastitis, resistant microorganism, plant extract, lectin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2 BIOFILMES.....	13
2.3 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	16
2.3.1 Lectinas.....	17
2.4 <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi.....	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. REFERÊNCIAS.....	24
5. CAPÍTULO I - Potencial farmacológico de antimicrobianos de origem vegetal frente a microrganismos causadores de mastite.....	30
6. CAPÍTULO II - Efeito do extrato de folhas de <i>Schinus terebinthifolia</i> sobre o crescimento, viabilidade e produção de biofilme por <i>Staphylococcus</i> spp. isolado de mastite caprina.....	45
7. CAPÍTULO III - Avaliação do efeito da lectina de folhas de <i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi sobre <i>Staphylococcus aureus</i>.....	62
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Etapas de formação e desenvolvimento dos biofilmes.....14
- Figura 2.** Rede de hemaglutinação resultante da ligação cruzada entre lectinas e carboidratos da superfície dos eritrócitos.....18
- Figura 3.** *Schinus terebinthifolia* Raddi. A. Hábito. B. Folhagens. C. Frutos.....21

CAPÍTULO II - Efeito do extrato de folhas de *Schinus terebinthifolia* sobre o crescimento, viabilidade e produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. isolado de mastite caprina

Figura 1: Curvas de crescimento (24 h de incubação) de *S. aureus* 24 (A), *S. aureus* 32 (B), *Staphylococcus* sp. 1 (C) e *Staphylococcus* sp. 2 (D) na ausência (controle negativo) ou presença do extrato salino de *Schinus terebinthifolia* em diferentes concentrações. Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (SD) de três experimentos.....53

Figura 2: Formação de biofilme de *S. aureus* 24 (A), *S. aureus* 32 (B), *Staphylococcus* sp. 1 (C) e *Staphylococcus* sp. 2 (D) na ausência (controle negativo) ou na presença do extrato salino de *Schinus terebinthifolia* em diferentes concentrações. A formação de biofilme foi avaliada pelo método de cristal violeta e pela medição da densidade óptica a 570 nm. Coluna azul corresponde a crescimento bacteriano e coluna vermelha a formação de biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle negativo.....55

Figura 3: Efeito do extrato salino de *Schinus terebinthifolia* sobre biofilmes pré-formados de cepas de *S. aureus* 24 (A), *S. aureus* 32 (B), *Staphylococcus* sp. 1 (C) e *Staphylococcus* sp. 2 (D). Os valores obtidos para o biofilme não tratado (controle não tratado) corresponderam a 100% da biomassa do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.....56

CAPÍTULO 3 - Avaliação do efeito da lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* raddi sobre *Staphylococcus aureus* e investigação de citotoxicidade para células normais de caprinos

Figura 1: Curvas de crescimento (20 h de incubação) de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes a oxacilina (UFPEDA 670) na ausência (controle negativo) ou presença de SteLL em diferentes concentrações. Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (SD) de três experimentos.....70

Figura 2: Análise por citometria de fluxo da viabilidade de isolados de *Staphylococcus aureus* sensível (UFPEDA 02) ou resistente à oxacilina (UFPEDA 670) tratados com SteLL na sua concentração mínima inibitória (CMI). (A e B) Sobreposição dos histogramas de marcação de células de *S. aureus* UFPEDA-02 e UFPEDA-670 com iodeto de propídeo (canal FL3) CN ou tratadas com SteLL. Plotagens de pontos FSC vs. SSC para determinação de alterações morfológicas em relação ao tamanho, forma e complexidade das células de *S. aureus* UFPEDA 02 (C e D) e UFPEDA 670 (E e F). No controle negativo (CN), foi utilizada água destilada em substituição à lectina. Álcool isopropílico foi utilizado como controle positivo.....72

Figura 3: Atividade antibiofilme de SteLL contra os isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes à Oxacilina (UFPEDA 670). As células foram tratadas por 24 h com a lectina e a formação do biofilme foi avaliada pelo método do cristal violeta e medição da densidade óptica em 570 nm. Células tratadas com água destilada corresponderam ao controle negativo (CN). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.....73

Figura 4: Efeito de SteLL sobre biofilmes pré-formados de isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis UFPEDA 02 ou (B) resistentes à Oxacilina (UFPEDA 670). Os valores obtidos para o biofilme não tratado (controle não tratado) corresponderam a 100% da biomassa do biofilme. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.....74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I - Potencial farmacológico de antimicrobianos de origem vegetal frente a microrganismos causadores de mastite

Tabela 1. Espécies vegetais com potencial antimicrobiano contra bactérias isoladas de mastite.....	34
---	----

CAPÍTULO II - Efeito do extrato de folhas de *Schinus terebinthifolia* sobre o crescimento, viabilidade e produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. isolado de mastite caprina

Tabela 1: Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) do extrato salino de <i>Schinus terebinthifolia</i> frente a espécies de <i>Staphylococcus</i> causadoras de mastite.....	52
--	----

Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana do extrato salino de <i>Schinus terebinthifolia</i> e drogas padrão (separados ou em combinação) contra espécies de <i>Staphylococcus</i> causadoras de mastite.	57
--	----

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão associadas à incidência de uma grande variedade de infecções crônicas persistentes em humanos e outros animais representando um sério problema de saúde pública. Nesse contexto, *Staphylococcus aureus* é considerada uma das espécies de bactérias de maior relevância (LISOWSKA-ŁYSIAK et al., 2021). Apesar de ser encontrada naturalmente na microbiota humana, ao proliferar na corrente sanguínea e tecidos, esta bactéria pode causar desde infecções cutâneas menores a doenças sistêmicas com alto risco de mortalidade (TAN et al., 2018). Além disso, *S. aureus* também é considerada o principal agente etiológico de mastite, infecção intramamária que acomete gados leiteiros, causando prejuízos econômicos e de produtividade (RAINARD et al., 2018).

A capacidade de formar biofilmes – comunidades microbianas aderidas a superfícies inertes ou vivas – contribui para a elevada patogenicidade de *S. aureus*, uma vez que facilita a resistência a drogas e a adaptação fenotípica (YIN et al, 2019). Os biofilmes destas bactérias podem se associar a dispositivos médicos implantados, como cateteres urinários, válvulas cardiovasculares e lentes de contato, ou a tecidos do hospedeiro, como por exemplo, feridas crônicas e epitélio de glândulas mamárias (OTTO, 2018; PÉREZ et al., 2020). Independentemente do local de colonização, a formação de biofilme é um fator que dificulta a erradicação de infecções causadas por *Staphylococcus*, pois auxilia as células bacterianas a se evadirem das defesas inatas do hospedeiro e as tornam intolerantes aos tratamentos convencionais baseados em antibioticoterapia (SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

A Organização Mundial da Saúde reconhece os desafios impostos pela resistência antimicrobiana e considera *S. aureus* como um patógeno de alta prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017). Nesse sentido, pesquisas voltadas a antimicrobianos naturais têm se intensificado. As plantas, por exemplo, produzem uma infinidade de compostos resultantes de suas atividades metabólicas, com estrutura, atividade e propriedades farmacológicas diversas (ANAND et al., 2019). Estes compostos podem atuar no combate a microrganismos multirresistentes em preparações complexas, como é o caso dos extratos vegetais, ou isoladamente, quando as moléculas passam por algum processo de purificação (CARVALHO et al., 2015; HOU et al., 2022; SILVA et al., 2021b).

Lectinas, proteínas isoladas de uma grande diversidade de organismos, inclusive plantas, são moléculas que podem desencadear diferentes tipos de alterações no funcionamento de uma célula ao interagirem com carboidratos presentes em superfícies celulares (HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018). As propriedades biológicas destas proteínas as tornam interessantes candidatas para uso biotecnológico em diversas áreas que incluem a saúde humana e animal (COELHO et al., 2017). Pesquisas recentes demonstram resultados notáveis da ação de lectinas vegetais contra microrganismos resistentes, interferindo no crescimento e sobrevivência das bactérias, bem como na formação de biofilmes e erradicação de biofilmes já formados (SILVA et al., 2019; CORIOLANO et al., 2020; MOURA et al., 2021).

Schinus terebinthifolia (Anarcadiaceae) é uma planta conhecida como aroeira-vermelha, nativa da costa brasileira com propriedades medicinais amplamente utilizada na cultura popular (CAMAROTI et al., 2018). Seus efeitos cicatrizantes, analgésicos, antioxidantes, anti-inflamatórios e anticâncer foram amplamente relatados (CARVALHO et al., 2013; BERNARDES et al., 2014; ROSAS et al., 2015). Estudos demonstraram que extratos obtidos a partir de suas casca e folhas exibiram propriedades antibacteriana, larvicida e inseticida (PROCÓPIO et al., 2015; CARMINATE et al., 2017; CAMAROTI et al., 2018). Além disso, uma lectina (StELL) foi isolada de folhas da planta *S. terebinthifolia* e apresentou atividade antimicrobiana contra espécies que causam doenças em humanos (GOMES et al., 2013; LIMA et al., 2019; NUNES et al., 2022).

Os relatos prévios do potencial farmacológico de *S. terebinthifolia* e a ampla gama de atividades biológicas exercida por extratos e lectinas vegetais incentivaram uma investigação mais aprofundada da ação antimicrobiana dos produtos isolados dessa planta. Diante disto, o presente trabalho propôs a avaliação da ação antibacteriana e antibiofilme do extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* (ES) e de StELL contra cepas de *Staphylococcus* de importância na medicina humana e veterinária, fornecendo subsídios para estudos que visem o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Além disso, uma revisão narrativa sobre a ação de derivados de plantas sobre microrganismos causadores de mastite é apresentada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* comumente é dividido em dois grupos que são diferenciados com base na produção da enzima coagulase. O grupo dos Estafilococos coagulase-positivo inclui geralmente os microrganismos patogênicos, enquanto os coagulase-negativos são saprófitos e podem causar infecções oportunistas (BECKER et al., 2014). As espécies de *Staphylococcus* são agentes etiológicos de doenças com várias localizações, manifestações e/ou cursos de infecção (LISOWSKA-ŁYSIAK et al., 2021).

Staphylococcus aureus é uma das espécies mais estudadas do gênero, em virtude de ser uma frequente causa de sérias infecções com alta morbidade e mortalidade ao redor do mundo (GIUDICE, 2020; SAKR et al., 2018). É uma bactéria Gram-positiva com pigmentação dourada em suas colônias, comensal, coagulase-positiva, capaz de formar cocos e produzir microcápsulas (LOWY, 1998). Seu primeiro isolamento ocorreu em 1880 por Alexander Ogston durante a investigação de infecção de feridas, na qual foi detectada, através de exame microscópico, a presença de cocos Gram positivos (ALGAMMAL et al., 2020).

Em humanos, *S. aureus* pode ser encontrada naturalmente na microbiota, mas pode ser prejudicial ao colonizar a pele, narinas e intestino, podendo causar também infecções em tecidos moles (músculos e vísceras), endocardite, osteomielite, pneumonia e sepse (CRUZ; VAN STRIJP; BAGNOLI, 2019). Além disso, relatos demonstram a ocorrência desta bactéria em animais, causando infecções em animais domésticos, mamíferos de grande porte e ruminantes (LIRA et al, 2016; ATTILI et al., 2020; CHUEAHIRAN et al., 2021; FRATINI et al, 2021).

A patogenicidade de *S. aureus* está relacionada à sua habilidade de produzir um grande arsenal de fatores de virulência que aumentam a capacidade do microrganismo de se estabelecer e sobreviver dentro do hospedeiro (ANDRADE et al., 2021). O controle da produção destes fatores é realizado por redes regulatórias complexas que permitem que a bactéria se adapte e sobreviva em diferentes ambientes. O regulador mais proeminente é o regulador de gene acessório (*rga*) que constitui um sistema de detecção (*quorum sensing*) ativado por sinais de um peptídeo

autoindutor (JENUL, 2018). Os principais fatores de virulência produzidos através deste sistema incluem componentes estruturais e produção de enzimas e toxinas (ABRIL et al., 2020).

Os componentes estruturais compreendem proteínas ancoradas na superfície celular bacteriana que se ligam a diferentes moléculas e estão envolvidas na adesão aos tecidos do hospedeiro e evasão do sistema imunológico. As proteínas estafilocócicas mais comuns são proteínas com afinidade ao fibrinogênio (ou seja, fatores de aglutinação A e B, codificadas pelos genes *ClfA* e *clfB*, respectivamente), fibronectina (*fnbA*), colagênio (*CNA*), sialoproteína (*bbp*), elastina (*ebpS*), adesinas com função desconhecida (*sdrC* e *sdrE*) e a proteína A (CASTRO, 2018).

As enzimas e toxinas secretadas por *S. aureus* são responsáveis por modular a resposta do hospedeiro e causar uma grande variedade de doenças. Coagulases, proteases e nucleases são enzimas que podem interferir em aspectos do sistema de coagulação e degradar componentes do tecido do hospedeiro (TAM e TORRES, 2019). As toxinas, por sua vez, se dividem em 3 grupos: (i) Superantígenos (SE, TSS1) que interferem na função de receptor, podendo causar síndrome do choque tóxico e intoxicações alimentares; (ii) toxinas esfoliativas (ETA, ETB e ETD) que destroem a função da barreira epidérmica, facilitando a invasão bacteriana e (iii) citotoxinas, que danificam a membrana celular, resultando no efluxo de metabólitos e moléculas (KIM, 2019).

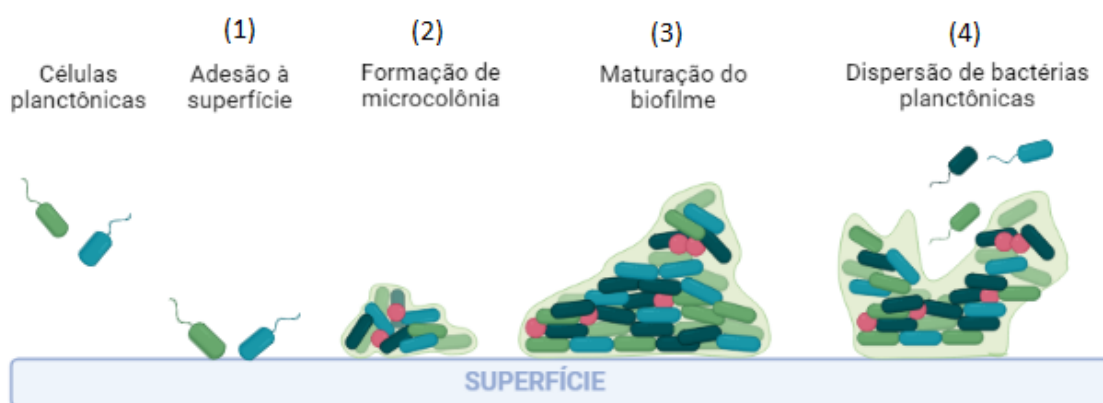
2.2 Biofilmes

Na maioria das infecções crônicas, outro fator de virulência bacteriano recorrente é a formação de biofilmes, o que permite aos microrganismos se adaptarem a condições desfavoráveis (YONG et al, 2019). Biofilmes são definidos como uma comunidade complexa de células microbianas capaz de aderir a superfícies bióticas ou abióticas que podem ser constituídas por populações de uma mesma espécie ou por múltiplas espécies bacterianas (COSTERTON, 1999). As células dentro do biofilmes estão envolvidas por uma matriz polimérica extracelular autoproduzida composta de água, exopolissacarídeos, proteínas, lipídios, DNA, RNA e outros componentes celulares (SUTHERLAND, 2001).

As etapas que demonstram a formação e desenvolvimento dos biofilmes microbianos (Figura 1) incluem: (i) uma fixação inicial reversível dos microrganismos

a uma superfície, mediada por proteínas ancoradas em sua superfície celular; (ii) em seguida as células iniciam uma fase de intenso crescimento e divisão na qual começam a formar microcolônias; (iii) o estágio seguinte compreende a maturação do biofilme, facilitada por uma adesina polissacarídica, em que canais distribuem nutrientes e moléculas sinalizadoras dentro do biofilme; e, finalmente, (iv) o estágio de destacamento ou dispersão, no qual o biofilme atinge uma massa crítica e começa a gerar células planctônicas que estarão livres para migrar e se fixar em outras superfícies (QIAN et al., 2019).

Figura 1. Etapas da formação e desenvolvimento de biofilmes microbianos.



Fonte: A autora

A formação dos biofilmes é coordenada por um mecanismo de comunicação célula-célula denominado *quorum sensing* (QS), no qual o acúmulo de moléculas sinalizadoras no ambiente extracelular leva à regulação da expressão de genes específicos (SHARMA et al., 2018). Desta forma, o QS permite que as bactérias sincronizem seu comportamento em uma escala populacional para que ajam como um organismo multicelular. Este sistema regulatório é parte indispensável dos mecanismos de transmissão microbiana em resposta a condições extremas (YIN et al., 2019). Bactérias patogênicas, incluindo, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae*, utilizam uma ampla gama de moléculas de sinalização QS para ativar sua virulência (SAXENA et al., 2019).

O modo de vida do biofilme confere aos microrganismos vários benefícios de sobrevivência, sendo o mais vantajoso a resistência a antibióticos. Bactérias

associadas a biofilmes, toleram concentrações até 1000 vezes maiores destes agentes antimicrobianos do que quando estão na condição de células planctônicas (ROY et al., 2018). Muitos fatores podem estar envolvidos na redução da suscetibilidade do biofilme aos antibióticos, sendo os mais difundidos: a própria arquitetura dos biofilmes que pode servir como barreira física; os componentes da matriz exopolissacarídica na qual as células estão inseridas; o aumento da expressão de determinadas enzimas, como por exemplo a β -lactamase; a lenta taxa de crescimento das células dentro do biofilme; aquisição de genes de resistência a múltiplas drogas por transferência horizontal, entre outros (KEAN et al, 2018; YIN et al, 2019; ZHANG et al, 2020).

A capacidade de *S. aureus* de formar biofilmes a torna um dos principais agentes envolvidos em infecções nosocomiais, aumentando significativamente a taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes (KONG et al., 2018). As cepas de *S. aureus* podem se fixar e persistir em tecidos do hospedeiro, como válvulas ósseas e cardíacas, para causar doenças como osteomielite, endocardite e rinossinusite crônica ou podem se associar a materiais implantados, como cateteres, articulações protéticas e marca-passos, o que é crucial para sua patogenicidade (DEMIR et al., 2019; LADE et al., 2019).

Além de causar infecções em humanos, *S. aureus* é considerado o agente etiológico causador de mastite – infecção na glândula mamária - mais prevalente em bovinos, búfalos e pequenos ruminantes, como ovelhas e cabras (SANTOS et al., 2019; BULDAIN et al., 2020; GIOVANNI et al., 2020; FRATINI et al., 2021). A formação de biofilme de *S. aureus* nos tecidos destes animais favorece a sua adesão e colonização ao epitélio da glândula mamária, contribuindo para evasão das defesas imunológicas e resistência antimicrobiana (PÉREZ et al., 2020). Além disso, esta característica facilita a disseminação de fatores de virulência entre outras bactérias por meio de transferência de material genético (ANDRADE et al., 2021).

Uma vez que os biofilmes são muito difíceis de erradicar, a capacidade de *S. aureus* formar estes agregados microbianos representa um grande problema para a saúde pública, pois contribui para a dificuldade em tratar infecções persistentes (SCHILCHER; HORSWILL, 2020). Nesse sentido, métodos alternativos para a prevenção/erradicação de biofilmes tornam-se urgentemente necessários.

2.3 Produtos naturais com potencial antimicrobiano

Durante milhares de anos, os produtos naturais desempenharam um importante papel na prevenção e tratamento de doenças humanas e na pecuária. Baseado em seu valor na medicina tradicional, os produtos fornecidos pela natureza têm sido, até os dias atuais, a principal fonte de compostos empregados na descoberta e desenvolvimento de medicamentos (DAR et al., 2017). A eficácia de tais produtos está relacionada à complexidade de suas estruturas químicas tridimensionais bem organizadas que oferecem muitas vantagens em termos de eficiência e seletividade de alvos moleculares (YUAN et al., 2016).

A pouca ou nenhuma sensibilidade dos microrganismos às drogas utilizadas nas terapias atuais tem sido considerada a principal causa de infecções persistentes no ambiente hospitalar e na pecuária. Diante do aumento da incidência de microrganismos com elevada resistência, estratégias em pesquisa com produtos naturais com ação antimicrobiana podem contribuir para acelerar a produção de novas substâncias com potencial farmacológico (WU et al., 2019). Para que essas estratégias sejam efetivas no combate aos microrganismos resistentes, é indispensável que os novos agentes antimicrobianos possuam mecanismos de ação diferentes dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis (NADER et al., 2018).

As substâncias naturais utilizadas na formulação de remédios são oriundas de microrganismos terrestres ou marinhos, invertebrados, vertebrados e plantas. No que diz respeito às plantas, estas são utilizadas como medicamentos há mais de 5.000 anos como fonte de antibióticos, antineoplásicos, analgésicos, cardioprotetores, entre outros (BROWN et al., 2016; CHEN et al., 2016). Suas propriedades medicinais são atribuídas a grande variedade de compostos biologicamente ativos que elas possuem e que são produzidos através de um processo natural de crescimento e desenvolvimento ou em resposta a ataque de patógenos ou estresse (TRETIN et al., 2013). Esses compostos podem ser utilizados para reforçar o potencial de antibióticos mais antigos ou levar à descoberta de outras inovações terapêuticas (ANAND et al., 2019).

Os compostos bioativos com ação antimicrobiana derivados de plantas, podem ser classificados em vários grupos de acordo com sua composição, estrutura química, via biossintética ou solubilidade. Os principais grupos são os metabólitos primários, como as proteínas e os polipeptídeos, e os metabólitos secundários, que incluem os

alcalóides, compostos fenólicos, compostos contendo enxofre, cumarinas, terpenos e óleos essenciais (VAOU et al., 2021). A maioria dos extratos vegetais contém uma mistura complexa de alguns destes ingredientes bioativos, os quais, podem atuar de maneira sinérgica para exercer efeitos nos microrganismos patogênicos (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ et al., 2021).

Extratos de folhas de *Euphorbia lateriflora* foram agentes bacteriostáticos (CMI 6,25 mg/mL) e bactericidas (CMI 6,25 a 50 mg/mL) contra isolados sensíveis e resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilis*. A análise fitoquímica das preparações revelou a presença de terpenóides, saponinas, taninos, flavanóides, antraquinonas, esteróides e alcalóides (COKER; OAIKHENA; AJAYI, 2021). O extrato de *Lagotis brachystachya* apresentou atividade antibacteriana (zonas de inibição variando de 15,4 a 20,3 mm, valores de CMI de 6,25 a 25 mg/mL e CMB de 12,5 a 100 mg/mL), além de inibição e erradicação de biofilme contra *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (HOU et al., 2022).

Os mecanismos de ação bacteriostática e bactericida de compostos presentes nos extratos vegetais são diversificados. Os compostos podem agir contra a células bacterianas através da destruição da integridade da membrana celular que pode levar a vazamento de conteúdo intracelular e desequilíbrio do potencial elétrico. Pode causar também inibição da síntese de ácidos nucleicos, ATP, enzimas e toxinas bacterianas. Efeitos antibiofilmes resultantes das propriedades anti-aderência e anti-QS também são relatados (KHAMENEH et al., 2019; LAHIRI et al., 2019; BIHAREE et al., 2020).

Além das pesquisas sobre a atividade antimicrobiana observada em preparações complexas como os extratos derivados de plantas, estudos também relatam a ação de compostos vegetais isolados contra microorganismos causadores de infecções, como é o caso das lectinas.

2.3.1 Lectinas

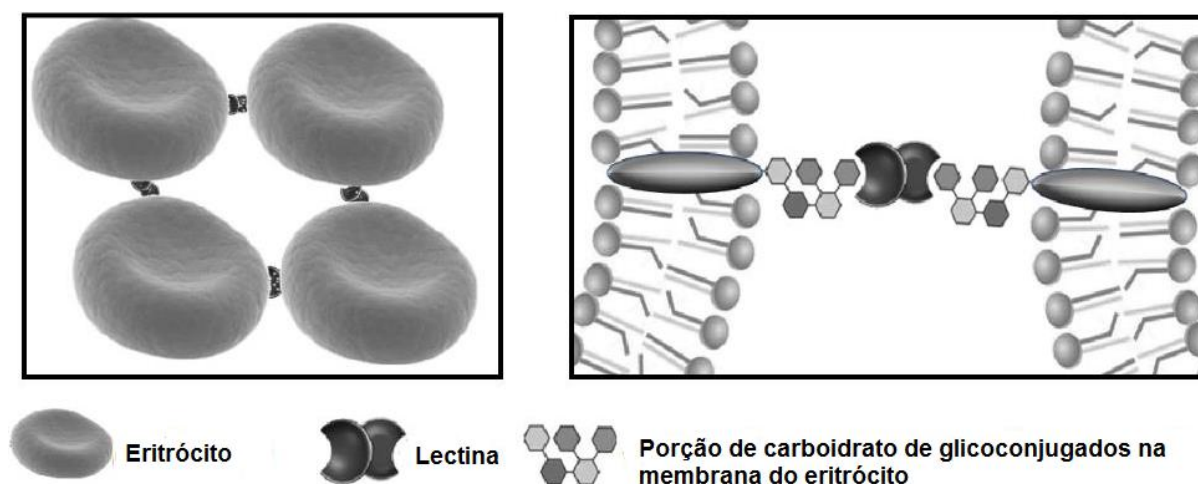
Lectinas são proteínas, simples ou conjugadas a carboidratos, que possuem pelo menos um domínio não catalítico e são capazes de se ligar de forma reversível a mono, oligo ou polissacarídeos de forma específica, sem alterar as suas

propriedades (COELHO et al., 2018). A ligação entre lectinas e carboidratos ocorre através de pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas (PAIVA et al., 2010). Estas proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microrganismos, animais e plantas (POMPEU et al., 2015).

Para detectar a presença de lectinas em uma amostra, comumente é realizado um ensaio de aglutinação, que consiste em verificar a interação destas proteínas com carboidratos presentes em superfícies celulares. O ensaio mais utilizado é o de hemaglutinação, devido à facilidade de visualização da aglutinação em eritrócitos humanos ou de outros animais. É realizada uma diluição seriada da amostra contendo lectina seguida posteriormente da incubação com eritrócitos (ALMEIDA et al., 2020). A formação de malha ou rede de aglutinação é mostrada na Figura 2.

Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante devem ser realizados para confirmar se o efeito observado é ocasionado pela presença de lectinas. O protocolo consiste em realizar uma diluição seriada da amostra contendo a lectina em uma solução de carboidratos antes dos eritrócitos serem adicionados. Os carboidratos livres passam a ocupar os sítios de ligação a carboidratos na molécula de lectina, impedindo a aglutinação dos eritrócitos que irão precipitar (PAIVA et al., 2012; LIMA et al., 2018).

Figura 2. Rede de hemaglutinação resultante da ligação cruzada entre lectinas e carboidratos da superfície dos eritrócitos



Fonte: Adaptado de Almeida et al. (2020)

As lectinas produzidas por plantas estão distribuídas em vários tecidos vegetais como casca, fruto, folha, raiz, sementes, caule, flores, entre outros, sendo encontradas em diferentes localizações celulares e possuindo variadas propriedades moleculares. Essas proteínas desempenham importantes papéis na defesa das plantas contra o ataque de microrganismos, por exemplo, inibindo o crescimento de fungos fitopatogênicos (DIAS et al., 2015). Quando estão presentes em bulbos, cascas e rizomas, as lectinas podem ter função fisiológica de reserva, fornecendo aminoácidos para o desenvolvimento da planta (OLIVEIRA et al., 2018).

Essas proteínas de características únicas têm sido utilizadas em diversos campos da biologia e à medida que mais lectinas estão sendo isoladas e seu papel na natureza elucidado, as possibilidades de aplicação são ampliadas e abrangem as áreas de pesquisa agrícolas e terapêuticas (HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018). Algumas atividades biológicas já descritas realizadas pelas lectinas vegetais, incluem atividade inseticida (PROCÓPIO et al., 2015; CAMAROTI et al., 2018), antitumoral (SINGH et al., 2016; RAMOS et al., 2018), imunomoduladora (CORIOLANO et al., 2018; SANTOS et al., 2020), antiinflamatória (ALVES et al., 2018; OLADOKUN et al., 2019), antinociceptiva (RAMOS et al., 2020), antifúngica (SILVA et al., 2019a; MOHSEN et al., 2019) e antibacteriana (SILVA et al., 2019b).

A atividade antibacteriana das lectinas resulta na inibição do crescimento da colônia ou indução de morte celular. A inibição pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos, como alteração na permeabilidade celular, levando à redução na absorção de nutrientes e/ou interação com receptores de membrana que desencadeiam respostas intracelulares. Já a morte celular pode ser consequência de danos causados à parede celular e à membrana plasmática, como por exemplo a formação de poros que resulta em extravazamento de conteúdo celular (PROCÓPIO et al., 2017). A lectina PeRoL, extraída da raiz de *Portulaca elatior*, demonstrou atividade bacteriostática contra *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (SILVA et al., 2019). WSMoL, a lectina hidrossolúvel de *Moringa oleifera*, apresentou atividade bacteriostática e bactericida para *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *Serratia sp.* (CORIOLANO et al., 2020).

As lectinas também demonstram um potencial adjuvante quando utilizadas em combinação com antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas. Um estudo realizado por Ferreira, et al (2018) revelou que a lectina ApuL isolada da inflorescência de *Alpinia purpurata* intensificou os efeitos terapêuticos dos antibióticos oxacilina e

ceftadizima contra *S. aureus* resistente à metilina e *P. auregiensa*, respectivamente. (FERREIRA et al., 2018). Lectinas extraídas da casca (MuBL) folhas (MuLL) e cerne (MuHL) de *Myracrodruon urundeuva* demonstraram efeitos sinérgico e aditivo em combinação com antibióticos (MOURA et al., 2021). A atuação destas biomoléculas em terapia combinada pode aumentar o espectro de ação dos antimicrobianos convencionais, diminuir os efeitos colaterais e reduzir o surgimento de microorganismos resistentes (SANTOS; PORTO; CAVALCANTI, 2021).

O reconhecimento de glicoconjugados da membrana de microrganismos também permite que as lectinas atuem como agentes inibidores da formação e crescimento de biofilme, através da inibição da adesão e invasão bacteriana e interferência no sistema de comunicação intracelular das comunidades microbianas, denominado *Quorum Sensing* (QS)(COELHO et al., 2018). Estudos conduzidos com a lectina PgTeL, isolada da sarcotesta de *Punica Granatum*, demonstraram que a lectina possui atividade antibiofilme contra isolados de *E. coli* produtoras de β - lactamases entre as concentrações de 6,25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (SILVA et al, 2019).

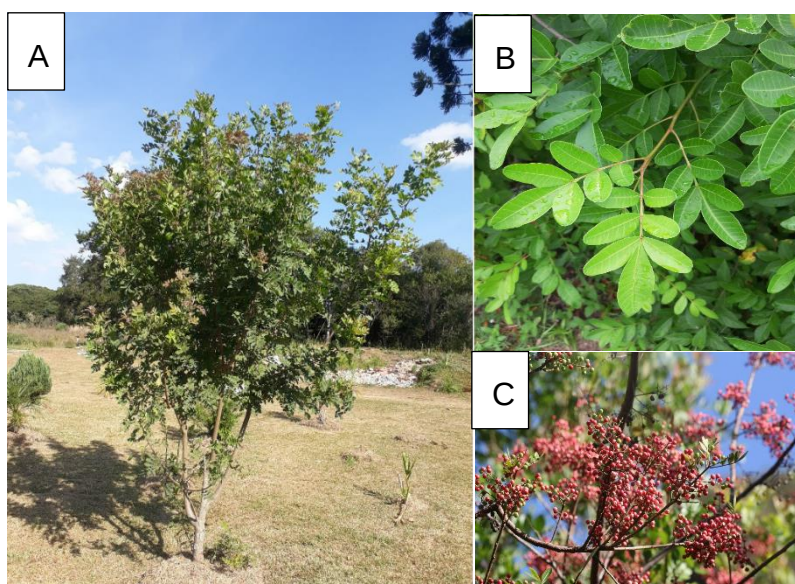
2.4 *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae)

A família Anacardiaceae é constituída por cerca de 800 espécies e 80 gêneros, sendo considerada uma família de plantas de importância econômica (MITCHELL et al., 2022). Muitas espécies desta família são apreciadas pelos seus produtos agroalimentares como é o caso do caju (*Anacardium*), manga (*Mangifera*) e pistache (*Pistascia*); pelas madeiras de qualidade e resistentes ao apodrecimento (*Schinopsis*, *Astronium*, *Myracrodruon*) e também por seu valor medicinal (*Spondias*, *Schinus* e *Rhus*, por exemplo) (PELL et al., 2010).

O gênero *Schinus* inclui cerca de 29 espécies e estudos que investigaram o perfil fitoquímico de suas espécies revelaram a presença de compostos bioativos como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, catequinas, terpenóides e óleos essenciais (EL-NASHAR et al., 2022). Diversas atividades biológicas resultantes da ação destes compostos vegetais têm incentivado os pesquisadores a explorar o potencial biotecnológico de espécies pertencentes a este gênero, entre as quais destaca-se a *Schinus terebinthifolia*.

S. terebinthifolia (Figura 3A) é uma planta nativa das Américas Central e do Sul e encontrada no Brasil desde a região Nordeste até a região Sul (LORENZI, 2008). Conhecida popularmente como aroeira vermelha, aroeira-da-praia, aroeira pimenteira, esta planta pode ser encontrada na forma de arbusto ou árvore (MINISTÉRIO DA SAÚDE E ANVISA, 2014). Na cultura popular *S. terebinthifolia* é amplamente utilizada para fins medicinais, atuando no tratamento de doenças do trato urinário e respiratório, em forma de banhos de assento após o parto como anti-inflamatório e cicatrizante, e suas folhas e frutos (Figuras 3A e 3B, respectivamente) são usados na limpeza de feridas e úlceras (LORENZI;MATOS, 2008). É relatada ainda sua atuação no tratamento de afecções, como diarreias, gastrites e dispepsias e sua expressão com propriedades antialérgicas (FALCÃO et al, 2015).

Figura 3. *Schinus terebinthifolia* Raddi. A. Hábito. B. Folhagens. C. Frutos.



Fonte: Disponível em < <https://www.gbif.org/species/3660419> > Acesso em: 04 out. 2022.

As aplicações biológicas de *S. terebinthifolia* têm sido estudadas há muitos anos e suas propriedades têm sido descritas desde a primeira edição da revista *Brazilian Pharmacopoeia*, publicada em 1926 (CARVALHO et al, 2013). Dentre os compostos produzidos por *S. terebinthifolia* com atividade biológica comprovada está o óleo essencial extraído de seus frutos, que apresentou atividade antioxidante e citotóxica contra tumores em mamas de humanos (BENDAOU et al., 2010).

Cavalher-Machado et al. (2008) demonstraram que compostos aromáticos isolados de *S. terebinthifolia* apresentam propriedades antialérgicas expressivas, representadas pelo impedimento da formação de edema, inibição da degranulação dos mastócitos e do influxo de eosinófilos como um resultado da diminuição da produção de mediadores eosinofílicos.

Extratos etanólicos da casca e folhas de *S. terebinthifolia* contendo alcaloides, taninos, flavonoides e saponinas foram ativos contra a bactéria *S. aureus* (CARMINATE et al., 2017). Atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (principal vetor da dengue, Zika, febre amarela e Chikungunya) foi demonstrada para o extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia*, que também interferiu no desenvolvimento de larva a pupa (PROCÓPIO et al., 2015). O extrato salino também apresentou propriedades inseticidas contra adultos de *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho) com taxas de mortalidade variando entre 94% e 97% após 12 dias de incubação (CAMAROTI et al., 2018). Após tratamento com o extrato de folhas de *S. terebinthifolia* em larvas de *Plutella xylostella*, foi observada atividade inseticida, pois o extrato causou mortalidade em insetos imaturos e um forte efeito de dissuasão da oviposição (SILVA et al., 2019c).

Gomes et al. (2013) isolaram e caracterizaram uma lectina ligadora de quitina (SteLL) a partir do extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* Raddi. SteLL é um polipeptídeo glicosilado de 14 kDa, com afinidade por quitina, e sua estabilidade em diferentes valores de temperatura e pH é uma característica físico-química que estimula o seu estudo como potencial agente para diversos fins em biotecnologia. Efeito antibacteriano foi relatado para SteLL contra *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*, bem como efeito antifúngico contra *Candida albicans*.

Estudos relataram que SteLL (5 mg/kg), demonstrou ação antitumoral para sarcoma 180, sem promover a perda de peso, alterações hematológicas ou efeitos genotóxicos em camundongos (RAMOS et al., 2019). A lectina em uma concentração de 16µg/mL ($8 \times$ CMI) aumentou a massa celular e o conteúdo de DNA de *S. aureus*, sugerindo que SteLL prejudica a divisão celular, e apresentou efeito imunomodulador ao induzir a liberação de citocinas (IL-6, IL-10, IL-17A e TNF- α), óxido nítrico e ânion superóxido pelos macrófagos infectados por *S. aureus* (LIMA et al., 2019). SteLL (12,5 µg/mL) apresentou atividade imunomoduladora frente a esplenócitos de camundongos Balb/c, aumentando a liberação das citocinas IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-

4 E IL-2 (SANTOS et al., 2020). Uma pesquisa recente desenvolveu uma nanossonda a partir da conjugação de SteLL com pontos quânticos carboxilados, para fins de estudos glicobiológicos (SILVA et al., 2021a).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antibacteriano e antibiofilme do extrato salino e da lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi contra isolados de *Staphylococcus*.

3.2 Objetivos específicos

- Revisar dados da literatura sobre o potencial farmacológico de antimicrobianos de origem vegetal para controle de mastite e seu mecanismo de ação.
- Investigar o efeito do extrato de folhas de *S. terebinthifolia* na viabilidade, crescimento e formação de biofilmes por *Staphylococcus* isolados de mastite caprina.
- Isolar a lectina de folhas de *S. terebinthifolia* (SteLL) por procedimento previamente estabelecido.
- Avaliar o potencial bacteriostático, bactericida e antibiofilme *in vitro* de SteLL contra *S. aureus* sensível ou resistente à Oxacilina.
- Determinar a capacidade de SteLL em causar alterações morfométricas nas células de *S. aureus* sensível ou resistente à Oxacilina

4 REFERÊNCIAS

ABRIL, A. et al. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. **Toxins**, v. 12, n. 9, p. 537, 20 ago. 2020.

ALGAMMAL, A. M. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 3255–3265, set. 2020.

ALGBURI, A. et al. Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 3, p. e02508-16, fev. 2017.

ALMEIDA, W. A. et al., The roles of bacterial membrane glycans and their importance as targets of antimicrobial lectins. In: TOFT, A. C. (ED.). **Frontiers in bacteriology research**. New York: Nova Science Publishers, Inc, 2020.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J. et al. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. **Phytomedicine**, v. 90, p. 153626, set. 2021.

ANAND, U. et al. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11, p. 258, 1 nov. 2019.

ANDRADE, N. C. et al. Virulence Factors in *Staphylococcus* Associated with Small Ruminant Mastitis: Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Genes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 633, 25 maio 2021.

ANVISA. Ministério da Saúde. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Schinus terebinthifolius* RADDI (AROEIRA-DA-PRAIA). Brasília, 2014.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, out. 2014.

BHATTACHARYA, M. et al. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 12, p. 1499–1516, 2 dez. 2015.

BIHAREE, A. et al. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104720, out. 2020.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, jan. 2016.

BULDAIN, D. et al. *Melaleuca armillaris* Essential Oil in Combination With Rifaximin Against *Staphylococcus aureus* Isolated of Dairy Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 344, 15 jul. 2020.

CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 81–89, jun. 2018.

CARMINATE, B. et al. ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 485, 7 fev. 2017.

CARVALHO, A. DE S. et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 402–408, abr. 2015.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 1, p. 158–169, 2013.

CASTRO, A. Chapter 8 - *Staphylococcus aureus*, a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. p. 26, 2018.

COELHO, L. C. et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, nov. 2018.

COELHO, L. C. B. B. et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–22, 2017.

COKER, M. E.; OAIKHENA, A. O.; AJAYI, T. O. Antimicrobial activity of extracts and fractions of *Euphorbia lateriflora* (Schum. and Thonn) on microbial isolates of the urinary tract. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 4723–4731, ago. 2021.

CORIOLO, M. C. et al. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 198–205, mar. 2020.

COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 21 maio 1999.

CRUZ, A. R.; VAN STRIJP, J. A.; BAGNOLI, F. Expressão do gene de virulência de *Staphylococcus aureus* em humanos. p. 9, 2019.

EL-NASHAR, H. A. S. et al. The genus *Schinus* (Anacardiaceae): a review on phytochemicals and biological aspects. **Natural Product Research**, v. 36, n. 18, p. 4833–4851, 17 set. 2022.

FERREIRA, G. R. S. et al. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 152–162, nov. 2018.

FRATINI, F. et al. Evaluation of the in vitro antibacterial activity of some essential oils and their blends against *Staphylococcus* spp. isolated from episodes of sheep

mastitis. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 32, n. 2, p. 407–416, jun. 2021.

GIOVANNI, N. et al. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in buffalo bulk tank milk and the farm workers in Italy. **Food Microbiology**, v. 91, p. 103509, out. 2020.

GIUDICE, P. Skin Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. **Acta Dermato Venereologica**, v. 100, n. 9, p. adv00110-215, 2020.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672–679, mar. 2013.

HOU, S. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of *Lagotis brachystachya* extract against extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* from broiler chickens. **Poultry Science**, v. 101, n. 1, p. 101555, jan. 2022.

JENUL, C. Regulação de Virulência de *Staphylococcus aureus*. p. 17, 2018.

KHAMENEH, B. et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 118, dez. 2019.

LAHIRI, D. et al. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 2, p. 52, jun. 2019.

LIMA, I. M. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18159, dez. 2019.

LISOWSKA-ŁYSIAK, K. et al. Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans: a Review. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 13–23, 1 mar. 2021.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 20 ago. 1998.

MITCHELL, J. D. et al. Neotropical Anacardiaceae (cashew family). **Brazilian Journal of Botany**, v. 45, n. 1, p. 139–180, mar. 2022.

MOURA, M. C. et al. Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on nonresistant and multidrug resistant isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 745–754, mar. 2021.

NADER, T. T. et al. Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1713–1719, set. 2018.

NUNES, M. A. S. et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf Lectin (SteLL) Reduces the Bacterial and Inflammatory Burden of Wounds Infected by *Staphylococcus aureus* Promoting Skin Repair. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 11, p. 1441, 21 nov. 2022.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 6.4.27, 27 jul. 2018.

PÉREZ, V. K. C. et al. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 792–802, set. 2020.

PROCÓPIO, T. F. et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 14 maio 2015.

QIAN, W. et al. Epidemiological Characteristics of *Staphylococcus Aureus* in Raw Goat Milk in Shaanxi Province, China. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 141, 8 set. 2019.

RAINARD, P. et al. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. 149–165, maio 2018.

RAMOS, D. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 148–157, abr. 2019.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, dez. 2015.

ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 31 dez. 2018.

SAKR, A. et al. *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization: An Update on Mechanisms, Epidemiology, Risk Factors, and Subsequent Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2419, 8 out. 2018.

SANTOS, A. J. C. A. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. 3 **Biotech**, v. 10, n. 4, p. 144, abr. 2020.

SANTOS, H. C. D. et al. Antimicrobial activity of propolis extract fractions against *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 954–960, dez. 2019.

SANTOS, J. V. DE O.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, I. M. F. Potential Application of Combined Therapy with Lectins as a Therapeutic Strategy for the Treatment of Bacterial Infections. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 520, 2 maio 2021.

SAXENA, P. et al. Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. **Indian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 3–12, mar. 2019.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. e00026-19, 19 ago. 2020.

SHARMA, C. et al. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 237, 8 jan. 2018.

SILVA, A. R. et al. Quantum dots conjugated to lectins from *Schinus terebinthifolia* leaves (SteLL) and *Punica granatum sarcotesta* (PgTeL) as potential fluorescent nanotools for investigating *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 232–240, dez. 2021a.

SILVA, P. M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 931–939, ago. 2019.

SILVA, J. D. F. et al. *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 291–297, abr. 2019a

SILVA, S. P. et al. Purification, Characterization, and Assessment of Antimicrobial Activity and Toxicity of *Portulaca elatior* Leaf Lectin (PeLL). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 21 ago. 2021b.

SILVA, P. R. C. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf extract is a larvicidal, pupicidal, and oviposition deterring agent against *Plutella xylostella*. **South African Journal of Botany**, v. 127, p. 124–128, dez. 2019c.

SUTHERLAND, I. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222–227, 1 maio 2001.

TAN, L. et al. Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (agr) System. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 55, 25 jan. 2018.

VAOU, N. et al. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2041, 27 set. 2021.

WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed (2017) Disponível em: < <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> >. Acesso em 29 ago. 2022

WU, S.-C. et al. Natural Products That Target Virulence Factors in Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 48, p. 13195–13211, 4 dez. 2019.

YIN, W. et al. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 12 jul. 2019.

ZHANG, K. et al. Promising Therapeutic Strategies Against Microbial Biofilm Challenges. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 359, 28 jul. 2020.

CAPÍTULO I

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE ANTIMICROBIANOS DE ORIGEM VEGETAL FRENTE A MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE

Talyta Naldeska da Silva¹, Lucas Gabriel Pita dos Santos¹, Patrícia Maria Guedes
Paiva², Thiago Henrique Napoleão², Pollyanna Michelle da Silva², Emmanuel
Viana Pontual^{1*}

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil. ² Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. * Autor correspondente

Resumo: A mastite é uma doença multifatorial inflamatória de glândulas mamárias causada por leveduras, fungos filamentosos e principalmente bactérias, que acomete rebanhos leiteiros em todo o mundo. O tratamento convencional compreende a administração de antibióticos, contudo, o surgimento de microrganismos resistentes tem comprometido a eficácia desta estratégia e estimulado a busca por terapias alternativas. Nesse sentido, estudos apontam o potencial antimicrobiano de preparações de origem vegetal, incluindo extratos e óleos essenciais, ou agentes isolados como lectinas (proteínas de ligação a carboidratos) e metabólitos secundários. Este trabalho proporciona uma revisão sobre a ação antimicrobiana de compostos vegetais contra agentes causadores de mastite. A ação antimicrobiana dos produtos vegetais pode acarretar danos à parede celular, peroxidação lipídica, alteração do potencial transmembrana, estresse oxidativo, formação de poros de membrana e alterações morfométricas que levam à apoptose ou ao aumento na permeabilidade celular. A atividade antibiofilme dos antimicrobianos vegetais pode resultar da inibição da adesão dos microrganismos, interferência com os sinais autoindutores de *quorum sensing* e/ou degradação da matriz exopolimérica, danificando a estrutura tridimensional do biofilme e expondo os microrganismos a antibióticos. Os dados aqui revisados demonstram que a variedade de compostos produzidos pelas plantas pode constituir uma fonte de novos fármacos para tratamento de mastite.

Palavras-chave: Mastite, microrganismo, biofilme, produtos naturais, ação antimicrobiana, resistência.

INTRODUÇÃO

Mastite é a infecção mais comum e desafiadora que ocorre entre os rebanhos leiteiros, reconhecida mundialmente por causar sérias perdas econômicas na indústria de laticínios e representar riscos à saúde animal e humana (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020). A doença é caracterizada por inflamação na glândula mamária que pode ser ocasionada por múltiplos fatores como traumas físicos, irritação por substâncias químicas ou infecção intramamária promovida por microrganismos, principalmente bactérias (ASHRAF & IMAHIN, 2020). Nas infecções de origem bacteriana, *Staphylococcus aureus* é considerado o agente mais prevalente (RAINARD et al., 2017).

A principal estratégia de tratamento da mastite se dá através da administração de antibióticos, no entanto a administração por longos períodos pode afetar a saúde do úbere e impulsionar a seleção de microrganismos resistentes, o que dificulta o controle da infecção (YUAN; PENG; GURUNATHAN, 2017; CERIOLI et al., 2018). Outra preocupação é a propagação destes microrganismos em resíduos do leite e derivados que pode levar a surtos de intoxicação alimentar, representando um grande risco à saúde de consumidores (DITTMAN et al., 2017; ONEN et al., 2018). Diante deste cenário, a exploração de abordagens terapêuticas alternativas que sejam mais eficazes e seguras torna-se urgente (SHARIFI et al., 2021).

As plantas representam uma fonte natural de diversas moléculas bioativas com potencial farmacológico, o que estimula sua exploração como material de partida para formulação de novas drogas. Os produtos do metabolismo de plantas podem exercer efeitos contra bactérias e assim serem utilizadas em substituição aos antibióticos comerciais ou atuar em combinação com estas drogas a fim de aumentar seu espectro de ação (ABDI; DEGO, 2019). Há relatos do efeito antimicrobiano de amostras vegetais complexas, como extratos e óleos essenciais, e de metabólitos isolados contra causadores de infecções em humanos e em outros animais (KARNWALL et al., 2021).

Com base em artigos publicados nos últimos cinco anos, através da coleta de dados e informações disponíveis em bases de pesquisas online, incluindo Scopus, Pubmed e Science direct, este trabalho proporciona uma revisão sobre as propriedades antimicrobianas de produtos de origem vegetal sobre

microorganismos causadores de mastite, bem como os mecanismos envolvidos nesta atividade.

1. Mastite

A presença de microorganismos causadores de mastite no tecido mamário desencadeia um processo inflamatório que compromete a qualidade do leite devido a alterações químicas e ao aumento na taxa de células somáticas no produto, o que resulta em graves prejuízos nas produções leiteiras (LAGONI *et al.*, 2006). Os causadores de mastite são diversos e incluem microalgas, leveduras e mais frequentemente bactérias (LAGONI *et al.*, 2006; ACOSTA *et al.*, 2016).

No Brasil, o gênero *Staphylococcus* é o mais frequentemente isolado em animais acometidos pela mastite, havendo relatos de espécies resistentes. Essa tem sido uma forte preocupação devido à possibilidade de realizarem a transferência de seus genes de resistência para cepas patogênicas para humanos (MOTA *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2015; ACOSTA *et al.*, 2016; SCHNITT e TENHAGEN, 2020).

De acordo com a sintomatologia, a mastite pode ser clínica ou subclínica. Na mastite clínica há sinais visíveis da infecção e os sintomas incluem ruborização e dor nas glândulas mamárias, podendo ocorrer o aparecimento de grumos no leite. Já nos casos de mastite subclínica, apesar de não haver sinais claros da infecção, ocorre geralmente a redução da produtividade de leite, tanto em volume quanto em qualidade (MESQUITA *et al.*, 2018; COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020). Com base na origem da infecção, a mastite pode ser ambiental, quando os patógenos se encontram no ambiente onde o animal é mantido; ou contagiosa, quando os patógenos são transmitidos pelos rebanhos através de contato com animais ou objetos infectados (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020).

O grave impacto econômico gerado pela mastite está principalmente associado à redução da qualidade do leite, que se torna impróprio para o consumo ou para a produção de derivados, além da desvalorização dos animais acometidos e do alto investimento para seu tratamento, que envolve a antibioticoterapia. Além disso, a alta frequência de isolados resistentes a antimicrobianos como amoxicilina, penicilina e ampicilina, dentre outros, intensifica os impactos à saúde

pública e as alternativas se tornam cada vez mais escassas acarretando em um cenário preocupante (LOPES et al., 2012; LIN et al., 2015; ACOSTA et al., 2016).

2. Antimicrobianos vegetais

O metabolismo das plantas é didaticamente dividido em metabolismo primário e metabolismo secundário. Os metabólitos primários possuem distribuição universal nas plantas e desempenham funções essenciais no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos; eles compreendem proteínas, lipídeos e carboidratos. Por outro lado, os metabólitos secundários são produzidos em resposta a condições ambientais, como o ataque de patógenos e herbívoros, e estão sujeitos a uma sazonalidade. Esses produtos permitem a adaptação da planta a condições desfavoráveis, e incluem flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, sesquiterpenos, saponinas, esteróis e derivados cinâmicos (GUERRIERO et al., 2018, YAN et al., 2018; ZAINARB et al., 2019).

Como consequência dessa diversidade metabólica, as plantas são tradicional e mundialmente utilizadas para prevenir e curar doenças, e com base em estudos aprofundados sobre esse potencial farmacológico, elas têm sido amplamente utilizadas para o desenvolvimento de novos medicamentos (KARNWAL, 2021). Muitos são os relatos de espécies vegetais com propriedades medicinais que incluem, por exemplo, os efeitos anticoagulante, antioxidante, anticâncer, anti-inflamatório, antimicrobiano e imunomodulador, estimulando um número cada vez maior de investigações dos derivados de planta para as mais variadas estratégias terapêuticas (DASH et al., 2016; KUMAR et al., 2019; SANTOS et al., 2020). Por serem naturais, estes produtos geralmente possuem maior especificidade de ação, são mais facilmente depurados dos organismos e exercem uma menor toxicidade orgânica e ambiental (CERIOLI et al., 2018).

Este trabalho destaca a ação antimicrobiana dos produtos vegetais, a qual envolve uma multiplicidade de mecanismos que fazem deles promissores inclusive para controle de patógenos multirresistentes, que são responsáveis pela persistência de infecções (MOURA et al., 2021). Além de apontar produtos vegetais com ação antimicrobiana direta, as pesquisas têm buscado compostos que sejam capazes de aumentar a susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos comercializados atualmente. Nesse sentido, misturas contendo

um metabólito vegetal e um antimicrobiano comercial podem resultar em maior eficácia devido à utilização de doses mais baixas, redução do surgimento de resistência bacteriana e dos efeitos colaterais (SANTOS; PORTO; CAVALCANTI, 2021). A Tabela 1 apresenta espécies vegetais como fonte de agentes antimicrobianos frente a patógenos causadores de mastite.

Tabela 1. Espécies vegetais com potencial antimicrobiano contra bactérias isoladas de mastite.

Espécie(s)	Preparação	Atividade antimicrobiana	Linhagem bacteriana	Autor(es)
<i>Rosa canina</i> , L. , <i>Juglans regia</i> L, <i>Rubus ulmifolius</i> , <i>Fragaria vesca</i> L <i>Pimpinella anisum</i> , L. <i>Coriandrum sativum</i> <i>Melissa officinalis</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> Labill <i>Tabebuia impetiginosa</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Matricaria recutita</i> L., <i>Echinacea purpúrea</i> <i>Pterospartum tridentatum</i>	Extratos metanoicos de flores, folhas, frutos e raízes	Efeito bacteriostático (CMI= 0,19 - 0,39 mg/ml)	Cepas padrão de <i>S. aureus</i> e isolados clínicos de vacas com mastite	GOMES et al., 2018
<i>Persicaria pensylvanica</i>	Extratos metanólicos de Flores, Folhas, Caule e Raízes	Inibição do crescimento (CMI variando de 7,8 a 62,5 µg/ml) e morte celular bacteriana (CMB variando de 31,25 a 187,5 µg/ml)	<i>S. aureus</i> Newbould 305, causadora de mastite bovina leve e crônica	ABDI; DEGO, 2019
<i>Rhodomyrtus tomentosa</i>	Extrato etanoico de folhas e o composto puro Rodormitona	Ação antibacteriana com CMI variando de 8 a 16 µg/mL (extrato) e 0,25 a 0,5 µg/mL (rodormitona). Efeito aditivo em combinação com oxitetraciclina ou pirlimicina em 0,5 × CMI	<i>S. aureus</i> isolado de mastite bovina	MORDMUANG et al., 2019

<i>Moringa oleifera</i>	Extrato aquoso de sementes	Atividade inibitória (CMI variando de 0,1906 a 6,1 mg/mL)	<i>Staphylococcus</i> spp. isolados de vacas com mastite	SILVA et al., 2020
<i>Helecteres isora</i> L	Extratos aquoso, etanoico, metanoico e de acetona do fruto	Atividade antibacteriana (CMI= 0,13 mg/mL e CMB= 0,52 mg/mL)	<i>S. aureus</i> isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica	SIRIMONG et al., 2021
<i>Timo daenensis</i> <i>Satureja hortensis</i>	Óleos essenciais	Inibição de crescimento com CMI= 0,0625 mg/mL (<i>T. daenensis</i>) e 0,125 mg/mL (<i>S. hortensis</i>). Morte celular (CMB= 0,125 mg/mL). Atividade antibiofilme em concentrações subinibitórias.	<i>S. aureus</i> isolados de leite de vacas com mastite subclínica	SHARIFI et al., 2018
<i>Melaleuca armillaris</i>	Óleos essenciais + Rifaximina	Efeito inibitório e bactericida. Efeito sinérgico em combinação com Rifaximina	<i>S. aureus</i> isolado de vacas com mastite subclínica	Buldain et al., 2020
<i>Thymus capitatus</i> <i>Cinnamomum zeylanicum</i> <i>Thymus serpyllum</i> , <i>Satureja montana</i> <i>Helichrysum italicum</i>	Óleos essenciais sozinhos e em mistura	Atividade antibacteriana (CMI= 0,94 – 14,73 g/mL) (CMB= 1,86 – 58,94 g/mL). Efeito sinérgico.	<i>Staphylococcus</i> spp isolado de mastite em ovelha	FRATINI et al., 2021
<i>Lippia organoides</i> <i>Lippia alba</i> <i>Cymbopogon citratus</i>	Óleos essenciais	Atividade antibacteriana (CMI= 560-1280 e CMB= 613- 1333 µg / mL)	<i>Staphylococcus</i> spp. E <i>S. aureus</i> isolados de mastite ovina e caprina.	FURLANI et al., 2021
<i>Caliandra surinamensis</i>	Lectina de folhas (CasuL)	Atividade antibacteriana (CMI= 3,75 a 15 µg / mL) e antibiofilme. Efeito sinérgico em combinação com antibióticos.	<i>Staphylococcus</i> isolados de mastite bovina (Ssp6PD e Sa) e caprina (Ssp5D e Ssp01)	PROCÓPIO et al., 2019

CMI: Concentração Mínima Inibitória; CMB: Concentração Mínima Bactericida.

2.1 Extratos brutos

Os extratos de plantas compreendem preparações de composição complexa que podem ser obtidos através de infusão, decocção, maceração, percolação, extração contínua quente, extração aquoso-alcoólica por fermentação, entre outros métodos (PANDEY; TRIPATHI, 2014). Os extratos são amplamente explorados na nutrição animal e podem representar alternativas às drogas de uso veterinário por exibirem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (SHARMA et al., 2018). Uma vez que apresentam composição complexa, os extratos podem atuar por múltiplos mecanismos, e a ação antimicrobiana destes pode incluir efeitos como a interação com proteínas bacterianas e estruturas da parede celular, prejuízos à integridade da membrana celular e sua fluidez, inibição da síntese de ácido nucléico e interferência na síntese da parede celular ou no metabolismo energético dos microrganismos (LAHIRI et al., 2019).

Relatos têm mostrado que extratos de plantas podem ser agentes antimicrobianos para microrganismos isolados de mastite. Como exemplo disso, extratos metanólicos de 14 espécies de plantas aquáticas foram testadas contra diferentes cepas de *S. aureus*, sendo uma de coleção e 6 isoladas de vacas com mastite. Dentre os extratos estudados, aqueles que demonstraram melhor efeito antibacteriano foram o extrato de folhas de *Eucalyptus globulus*, o qual apresentou valores de concentração mínima inibitória (CMI) variando de 0,19 a 0,39 mg/mL, seguido pelo extrato de folhas de *Juglans regia* (CMI de 0,78 a 1,56 mg/mL) e pelo extrato de partes aéreas de *Foeniculum vulgare* (CMI de 3,125 a > 6,25 mg/mL). Devido à maior eficácia do extrato de *E. globulus*, em comparação às outras espécies utilizadas neste trabalho, foi realizada a análise de sua composição que revelou a presença de 19 compostos fenólicos, sendo 16 flavonoides (principalmente derivados de quercetina) e 3 ácidos fenólicos (principalmente ácido gálico e derivados do ácido láctico) (GOMES et al., 2018).

Motivado pelos relatos de potencial medicinal, um estudo avaliou a atividade antimicrobiana de extratos da espécie herbácea *Persicaria pensylvanica* (Polygonaceae) contra uma cepa de *S. aureus* causadora de mastite bovina (ABDI et al., 2019). Os resultados demonstraram que os extratos de flor, folha, caule e raiz inibiram o crescimento bacteriano (CMI de 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 7,8 µg/ml e <46,9 µg/ml, respectivamente) e apresentaram efeito bactericida (concentração

mínima bactericida – CMB de 125 µg/mL, 31.25 µg/mL, 31.25 µg/mL e ≤ 187.5 µg/mL, respectivamente).

O extrato etanólico de folhas de *Rhodormyrtus* (Myrtaceae) e a rodormitona isolada a partir dele apresentaram um forte efeito inibidor de crescimento com CMI variando de 8 a 16 µg/mL para o extrato e 0,25 a 0,5 µg/mL para a rodormitona, e causaram a redução da internalização da bactéria em células epiteliais de mama bovina. Adicionalmente, os autores reportaram o efeito aditivo do extrato em combinação com os antibióticos oxitetraciclina e pirlimicina, reduzindo os respectivos CMI em 64 e 128 vezes (MORDMUANG et al., 2019).

Outra preparação relatada como agente antibacteriano foi o extrato aquoso de sementes de *Moringa oleifera*, o qual inibiu (CMI variando de 0,1906 a 3,05 mg/mL) o crescimento de cepas de bactérias isoladas de mastite portadoras dos genes *norA*, *norC*, *tet-38*, e *msrA*, que conferem resistência a diferentes drogas como quinolonas, tetraciclina, eritromicina e macrolídeos. Extratos do fruto de *Helecteres isora* L. em água, etanol, metanol ou acetona contendo compostos fenólicos, flavonoides, taninos e alcaloides apresentaram efeitos bacteriostáticos e bactericidas para cepas de *S. aureus* isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica (SIRIMONG et al., 2021).

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de plantas cuja composição está associada a estresse ambiental, ou ao ataque de herbívoros ou microrganismos patogênicos, ou ainda outras condições estressoras, de acordo com uma sazonalidade; em adição OEs podem exercer funções decorrentes de uma coevolução entre a espécie produtora e espécies de insetos polinizadores, ou com outras espécies de plantas com as quais se relacionam por alelopatia (DE JESUS et al., 2020).

OEs são geralmente constituídos por uma mistura de 20 a 60 compostos, que pertencem principalmente à classe dos terpenos, terpenoides e fenilpropenos (PEDONESE et al., 2017). A obtenção dos OEs pode ser realizada a partir de diferentes métodos como hidrodestilação, destilação a vapor, destilação seca ou prensagem mecânica a frio de plantas (WINSKAS et al., 2019). Semelhante ao que ocorre em extratos vegetais, a composição complexa dos OEs acarreta geralmente na presença de mais de um ingrediente ativo, os quais podem atuar por efeito

sinérgico ou mesmo aditivo, resultando em uma multiplicidade de mecanismos de ação antimicrobiana e isso tem despertado interesse de pesquisas em saúde, inclusive para controle de doenças como a mastite (CORONA-GÓMES et al., 2022).

Os constituintes químicos, responsáveis pela atividade antimicrobiana dos OEs, podem agir na membrana plasmática bacteriana, aumentando sua permeabilidade e causando extrusão do material intracitoplasmático, ou ainda danificando proteínas de membrana, reduzindo síntese de ATP e acarretando desbalanço das enzimas responsáveis pela resistência bacteriana. Adicionalmente, podem formar uma camada no exterior da célula bacteriana que prejudica os processos de endocitose e exocitose, bem como seu metabolismo, levando à morte celular. Outro efeito importante dos OEs antimicrobianos que tem sido bem reportado é a propriedade antibiofilme. Esta atividade pode resultar da interação dos seus constituintes com receptores de adesão celular ou da inibição do mecanismo de sinalização *quorum sensing* (QS), que está envolvido na virulência das bactérias, na secreção de toxinas e na resistência a antibióticos (LAHIRI et al, 2019; MITTAL et al, 2019).

Sharifi et al (2018) demonstraram que OEs de *Thymus daenensis* e *Satureja hortensis* exerceram um forte efeito inibitório (CMI 0,0625 e 0,125 mg/mL, respectivamente) sobre *S. aureus* isolados de amostra de leite de vacas com mastite, bem como causaram a morte das bactérias (CMB 0,125 mg/mL para ambos OEs) e inibiram a formação de biofilme ou foram eficazes em erradicar biofilmes preexistentes, mesmo em concentrações menores que os valores de CMI. Os autores mostraram que o OE de *S. hortensis* na CMI, pode atuar como um agente anti- QS, pois após o tratamento houve uma regulação negativa significativa do gene *hld*. Todos esses efeitos provavelmente estão relacionados à presença de compostos fenólicos como carvacrol, c- terpineno, a-terpineno e timol nos OEs (SHARIFI et al., 2018).

A análise cromatográfica do OE de folhas de *Melaleuca armillaris* revelou a presença do componente majoritário (72,3%) 1,8-cineol e, em menor proporção, limoneno (7,8%) e alfa pineno (6,0%). Esse OE apresentou potencial antibacteriano contra cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina (CMI de 12,5 µL/mL em pH 6,5-7,4; CMI de 6,25 µL/mL em pH 5) e demonstrou forte sinergismo

(FIC 0.38) em combinação com rifaximina, reduzindo a CMI em até 8 vezes (BULDAIN et al., 2020).

OEs de *Thymus capitatus*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Thymus serpyllum*, *Helichrysum italicum* e *Satureja montana* apresentaram efeito bacteriostático (CMI variando de 0,94 a 14.73 g/mL e CMB de 1,86 a 58,94 g/mL) sobre bactérias isoladas de ovelhas com mastite; adicionalmente, a mistura desses OEs (*T. capitatus* 40%, *C. zeylanicum* 20%, *T. serpyllum* 20%, *H. italicum* 20% e *S. montana* 20%) apresentou CMI e CMB de 0,47 g/mL, sugerindo um efeito sinérgico entre seus componentes (FRATINI et al, 2021). OEs de *Lippia origanoides* (alecrim pimenta), *Lippia alba* (erva cidreira) e *Cymbopogon citratus* (capim-santo) contendo carvacrol, citral, neral, geraniol foram citotóxicos para 15 isolados de mastite em caprinos e ovinos, os quais foram identificados como *Staphylococcus* spp. e *S. aureus* (FURLANI et al., 2021).

2.3. Lectinas

Lectinas constituem um grupo versátil de proteínas cuja atividade pode estar relacionada com estratégias de defesa, mas não são produzidas em resposta à sensibilização por um antígeno. Essas proteínas têm como característica a capacidade de ligar carboidratos através de domínio de reconhecimento (CRD, *carbohydrate-recognizing domain*) cuja interação ocorre de forma específica e reversível, sem alterar a estrutura covalente dos mono, oligo ou polissacarídeos que interagem com ele (HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018). Os CRDs das lectinas interagem com seus ligantes através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de Van der Waals (COELHO et al., 2017).

Apesar das lectinas serem expressas por outros seres como vírus, fungos, cianobactérias e animais, as plantas representam a fonte mais explorada para bioprospecção de lectinas, e isso se deve a alguns fatores que incluem facilidade de extração, alto rendimento e ampliação da especificidade a carboidratos (PROCÓPIO et al., 2017). O envolvimento dos CRDs das lectinas em diversas atividades biológicas tem sido relatado, dentre as quais este trabalho destaca a ação antimicrobiana contra patógenos causadores de infecções em humanos e outros animais (COELHO et al., 2018).

A lectina de folhas de *Caliandra surinamensis* (CasuL) apresentou atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina (Ssp6PD e Sa) e caprina (Ssp5D e Ssp01), com CMI variando de 3,75 a 15 µg/mL; em concentrações subinibitórias, CasuL inibiu a formação de biofilme pelos isolados Sa e Ssp5D e demonstrou efeito sinérgico quando combinada aos antibióticos ampicilina e tetraciclina (PROCÓPIO et al., 2019).

A inibição do crescimento bacteriano por lectinas tem sido atribuída à sua capacidade de interagir com componentes da superfície celular da bactéria. Já a atividade antibiofilme pode ser resultado da interação das proteínas com carboidratos da superfície do biofilme, reduzindo sua espessura e desconfigurando sua arquitetura molecular; além disso, alguns trabalhos observaram uma redução na expressão dos genes que são responsáveis pela formação do biofilme bacteriano (CAVALCANTE et al., 2013; COELHO et al., 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os relatos que apontam para a ineficácia do tratamento convencional da mastite em animais leiteiros, baseado em antibioticoterapia, são crescentes e isso tem sido atribuído principalmente ao aparecimento de bactérias multirresistentes, as quais podem se propagar através de resíduos de leite e derivados. Nesse sentido, este preocupante cenário impulsionou a busca por novas abordagens terapêuticas, principalmente envolvendo produtos de origem natural. Os dados previamente publicados e revisados aqui demonstram que as plantas produzem uma grande variedade de compostos que estão presentes em preparações como extratos e óleos essenciais ou moléculas isoladas com atividades biológicas. Estes compostos atuam através de diferentes mecanismos, exibindo propriedades antibacteriana e antibiofilme, isoladamente ou em combinação com outros agentes antimicrobianos. Diante disso, os ingredientes vegetais com propriedades antimicrobianas apresentam-se promissores como material de partida para idealização de novos fármacos, os quais podem vir a auxiliar no tratamento da mastite.

REFERÊNCIAS

- ABDI, R. D.; KERRO DEGO, O. Antimicrobial activity of *Persicaria pensylvanica* extract against *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 29, p. 100921, ago. 2019.
- ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, jul. 2016.
- ALLEMAILEM, K. S. Antimicrobial Potential of Naturally Occurring Bioactive Secondary Metabolites. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 13, n. 2, p. 155–162, jun. 2021.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, v. 21, n. 1, p. 36–49, jun. 2020.
- BULDAIN, D. et al. Melaleuca armillaris Essential Oil in Combination With Rifaximin Against *Staphylococcus aureus* Isolated of Dairy Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 344, 15 jul. 2020.
- CAVALCANTE, Theodora Thays Arruda et al. A ConA-like lectin isolated from *Canavalia maritima* seeds alters the expression of genes related to virulence and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2013, 2013.
- CERIOLI, M. F. et al. Effect of the Essential Oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling and Limonene on Biofilm Production in Pathogens Causing Bovine Mastitis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 146, 3 jul. 2018.
- COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLAMA, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2212, 26 nov. 2020.
- COELHO, L. C. et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, nov. 2018.
- DITTMANN, K. K. et al. *Staphylococcus aureus* in Some Brazilian Dairy Industries: Changes of Contamination and Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2049, 24 out. 2017.
- FRATINI, F. et al. Evaluation of the in vitro antibacterial activity of some essential oils and their blends against *Staphylococcus* spp. isolated from episodes of sheep mastitis. **Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali**, v. 32, n. 2, p. 407–416, jun. 2021.
- FURLANI, R. et al. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST PATHOGENS OF IMPORTANCE IN CAPRINE AND OVINE MASTITIS. **Revista Caatinga**, v. 34, n. 3, p. 702–708, set. 2021.

- GOMES, F. et al. Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 515–520, fev. 2018.
- GUERRIERO, G. et al. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. **Genes**, v. 9, n. 6, p. 309, 20 jun. 2018.
- KARNWAL, A. In vitro antibacterial activity of *Hibiscus rosa sinensis*, *Chrysanthemum indicum*, and *Calendula officinalis* flower extracts against Gram negative and Gram positive food poisoning bacteria. **Advances in Traditional Medicine**, 9 abr. 2021.
- KUMAR, G. et al. Anticancer activity of plant leaves extract collected from a tribal region of India. **3 Biotech**, v. 9, n. 11, p. 399, nov. 2019.
- LAHIRI, D. et al. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 2, p. 52, jun. 2019.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 51–54, 2006.
- LIM, S.-K. et al. 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, ago. 2013.
- LOPES, M. A. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 477–483, 2012.
- MESQUITA, A. A. et al. Contagem bacteriana total e contagem de células somáticas como indicadores de perdas de produção de leite. **Pubvet**, v. 12, n. 6, p. 1–8, jun. 2018.
- MITTAL, R. P.; RANA, A.; JAIRAK, V. Essential Oils: An Impending Substitute of Synthetic Antimicrobial Agents to Overcome Antimicrobial Resistance. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 6, p. 605–624, 29 mar. 2019.
- MORDMUANG, A. et al. Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using in vitro and in vivo models of mastitis. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 49, dez. 2019.
- MOTA, R. A. et al. PARTICIPAÇÃO DOS *Staphylococcus* spp NA ETIOLOGIA DAS MASTITES EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE PERNAMBUCO (BRASIL). **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 124–130, 30 mar. 2012.
- MOURA, M. C. et al. Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on nonresistant and multidrug resistant isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 745–754, mar. 2021.
- ONEN, S. P. et al. Investigation into toxin and slime genes in staphylococci isolated from goat milk and goat cheese in southern Turkey. **Thai J Vet Med.**, p. 9. 2018.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. p. 5, 2014.

PEDONESE, F. et al. Antimicrobial activity of four essential oils against pigmenting *Pseudomonas fluorescens* and biofilmproducing *Staphylococcus aureus* of dairy origin. **Italian Journal of Food Safety**, v. 6, n. 4, 11 dez. 2017.

PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. Antibacterials: synthesis, properties and biological activities. Nova Science Publishers Inc., New York, p. 69-89, 2017

PROCÓPIO, T. F. et al. Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, nov. 2019.

RAINARD, P. et al. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. 149–165, maio 2018.

SANTOS, A. J. C. A. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (StELL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, p. 144, abr. 2020.

SANTOS, J. V. DE O.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, I. M. F. Potential Application of Combined Therapy with Lectins as a Therapeutic Strategy for the Treatment of Bacterial Infections. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 520, 2 maio 2021.

SCHNITT, A.; TENHAGEN, B.-A. Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Dairy Herds: An Update. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 10, p. 585–596, 1 out. 2020.

SHARIFI, A. et al. Antibacterial, antibiofilm and antiquorum sensing effects of *Thymus daenensis* and *Satureja hortensis* essential oils against *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 379–388, fev. 2018.

SHARIFI, A. et al. *Cuminum cyminum* L. Essential Oil: A Promising Antibacterial and Antivirulence Agent Against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 667833, 4 ago. 2021.

SHARMA, C. et al. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 237, 8 jan. 2018.

SILVA, J. G. DA et al. Antimicrobial activity of polypyrrole nanoparticles and aqueous extract of *Moringa oleifera* against *Staphylococcus* spp. carriers of multi-drug efflux system genes isolated from dairy farms. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 3, p. 309–314, ago. 2020.

SIRIMONGKOLVORAKUL, S.; JASANCHEUN, A. Screening of in vitro antimicrobial effects of *Helicteres isora* extract against *Staphylococcus aureus*. **Veterinary World**, p. 2313–2316, 4 set. 2021.

WIŃSKA, K. et al. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2130, 5 jun. 2019.

YANG, L. et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 27 mar. 2018.

YUAN, Y.-G.; PENG, Q.-L.; GURUNATHAN, S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, p. 569, 6 mar. 2017.

ZAYNAB, M. et al. Role of primary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, p. 103728, dez. 2019.

CAPÍTULO II

EFEITO DO EXTRATO DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* SOBRE O CRESCIMENTO, VIABILIDADE E PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus* spp. ISOLADO DE MASTITE CAPRINA

Talyta Naldeska da Silva¹, Gustavo Ramos Sales Ferreira², Thiago Henrique Napoleão³, Rinaldo Aparecido Mota³, Patrícia Maria Guedes Paiva², Pollyanna Michelle da Silva², Emmanuel Viana Pontual^{1*}

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil. ² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil. ³ Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil. * Autor correspondente

Resumo: A mastite é uma inflamação na mama que acomete principalmente rebanhos leiteiros e geralmente ocorre devido a uma infecção por bactérias. Extratos vegetais com atividade antimicrobiana têm sido investigados como uma alternativa para controle de microrganismos causadores de mastite. Assim, este trabalho avaliou o efeito do extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* (ES) sobre isolados de *Staphylococcus* de mastite caprina. ES inibiu o crescimento dos isolados Sa24, Sa32, Ssp1 e Ssp2 com CMI de 1800, 900, 450 e 225 µg/mL, respectivamente, mas não foi agente bactericida. A análise de cinética de crescimento revelou que, na presença de concentrações subinibitórias (1/4 e 1/2 CMI) de ES, bem como na CMI, o crescimento bacteriano foi inferior ao detectado no controle, enquanto em concentrações maiores não foi detectado crescimento para todos os isolados testados. A formação de biofilmes pelos quatro isolados foi prejudicada por ES, para o isolado Sa32 entre as concentrações de 225 a 1800 µg/mL e para Sa24, Ssp1 e Ssp2 concentração de 450 a 1800 µg/mL. Adicionalmente, ação sinérgica foi detectada quando ES foi combinado com os antibióticos carbapenema e cephalexina frente a todos os isolados testados. Em conclusão, o extrato de folhas de *S. terebinthifolia* é agente antimicrobiano ativo contra bactérias causadoras de mastite caprina e seu potencial sinérgico quando combinado a antibióticos comerciais estimula a sua avaliação como novo biomaterial para tratamento de mastite.

Palavras-chave: mastite, *Staphylococcus*, antibiofilme, extrato vegetal, sinergismo

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é parte importante dos meios de subsistência de pequenos agricultores em muitos países, principalmente em áreas que detêm recursos limitados para cultivos agrícolas (MILLER; LU, 2019). O Brasil é considerado o maior país produtor de leite de cabra da América do Sul, tendo esta produção triplicado entre os anos de 1967 a 2017 (LU; MILLER, 2019). A qualidade nutricional e o baixo potencial alérgico do leite de cabra são fatores que contribuem para o aumento na busca deste alimento e de seus derivados (AKKOU et al., 2018). Esta ascensão da indústria de cabras leiteiras tem despertado a preocupação em relação ao bem-estar e desempenho produtivo destes animais (LEITE et al., 2020).

É reconhecido que práticas relacionadas a manejo e higiene inadequados de rebanhos leiteiros podem acarretar problemas à saúde dos animais, incluindo a ocorrência de mastite (SOUZA et al., 2021). Caracterizada por inflamação na glândula mamária, a mastite é uma doença que afeta não só o bem-estar do animal, mas também tem implicações na saúde pública e na economia (MILES; HUSON, 2021). Os efeitos negativos da mastite na pecuária leiteira estão relacionados principalmente à redução na produção e qualidade do leite, custos com tratamento e mão de obra, e propagação de infecções alimentares (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020).

Na maioria dos casos, a ocorrência de mastite em cabras resulta da ação de microrganismos do ambiente que podem infectar os animais durante ou entre os períodos de ordenha (MACHADO et al., 2018). Em pequenos ruminantes, bactérias do gênero *Staphylococcus* são consideradas os principais agentes causadores de mastite (ABDALHAMED; ZEEDAN; ABOU ZEINA, 2018). Um estudo realizado com caprinos leiteiros do Nordeste do Brasil detectou a ocorrência destes patógenos em amostras de leite, e a análise microbiológica revelou a presença de genes de resistência, bem como uma elevada frequência de resistência fenotípica a antimicrobianos de uso humano e veterinário (ARAGÃO et al., 2021).

Os genes detectados em *Staphylococcus* causadores de mastite estão, em sua maioria, associados à produção de fatores de virulência que auxiliam a bactéria na evasão da resposta imune do hospedeiro e da ação de antimicrobianos (SALABERRY et al., 2015). O biofilme, por exemplo, representa um fator de virulência importante para a invasão e manutenção das bactérias na glândula

mamária (NADER et al., 2018). As células bacterianas dentro do biofilme são difíceis de controlar e erradicar pois recebem proteção contra dessecação, perturbação química, invasão por outras bactérias, morte por células imunológicas, e podem tolerar concentrações até 1000 vezes maiores de antibióticos em comparação com células planctônicas (ZHANG et al., 2020).

Tem sido reportado que os microrganismos causadores de mastite têm desenvolvido multirresistência à antibioticoterapia convencional, e isso acarreta a dificuldade em tratar os animais, estimulando a busca por novos agentes antimicrobianos a partir de fontes alternativas. Neste contexto, pesquisas que investigam a eficácia de produtos naturais frente a bactérias causadoras de mastite têm crescido, e novos ingredientes vegetais têm sido apontados como promissores (KLHAR et al., 2019; PAŞCA et al., 2020). Os extratos de plantas apresentam em sua composição compostos fenólicos e outros fitoquímicos que podem atuar como agentes antimicrobianos através de diferentes mecanismos, representando assim, uma alternativa viável aos antibióticos atualmente disponíveis; adicionalmente, a multiplicidade de mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana de extratos, decorrente da sua composição complexa, pode contribuir para minimizar ou retardar o aparecimento de cepas de microrganismos resistentes (GOMES et al., 2019; KIM et al., 2022).

Schinus terebinthifolia (Anarcadiaceae) é uma planta amplamente encontrada na costa brasileira e distribuída desde a região Nordeste até a região Sul (CARVALHO et al., 2013). Comumente conhecida como aroeira da praia ou aroeira vermelha, esta planta é reconhecida pelo uso na medicina tradicional para o tratamento de doenças do trato urinário e respiratório, e ainda por exibir propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes (FEDEL-MIYASATO et al., 2014; FALCÃO et al., 2015; ROSAS et al., 2015). Extratos da casca e folha têm demonstrado diferentes atividades biológicas, entre elas, atividade antibacteriana (GOMES et al., 2013; CARMINATE et al., 2017), e inseticida (PROCÓPIO et al., 2015; CAMAROTI et al., 2018; SILVA et al., 2019).

Considerando os relatos anteriores das propriedades antimicrobianas de *S. terebinthifolia* e o potencial farmacológico de extratos vegetais frente a bactérias patogênicas, este estudo avaliou as atividades antibacteriana e antibiofilme do extrato salino de folhas de *S. terebinthifolia* contra *Staphylococcus* spp. isolados

de mastite em cabras. Em adição, investigamos os efeitos da combinação do extrato com antibióticos no crescimento microbiano.

2. METODOLOGIA:

2.1 Linhagens bacterianas, condições de cultivo e preparação das amostras

Cepas de isoladas de mastite, nomeadas como *S. aureus* 24 (Sa24), *S. aureus* 32 (Sa32), *Staphylococcus* sp. 1 (Ssp1) e *Staphylococcus* sp. 2 (Ssp2) foram mantidas em Caldo Mueller Hinton contendo glicerol 10% (v/v) a 20°C. Para realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio Agar Mueller Hinton *overnight* a 37°C. Em seguida, as colônias foram ressuspendidas em solução salina estéril (NaCl 0,15M) e ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) para a obtenção de suspensão bacteriana de 3×10^6 UFC/mL. Para o ensaio, as amostras foram filtradas em filtro de seringa PVDF 13 mm x 0,22 µm estéreis.

2.2 Preparação do extrato

Folhas de *S. terebinthifolia* foram coletadas na UFRPE, município de Recife (Pernambuco, Brasil), com autorização (36.301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente. O acesso ao material vegetal foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob o protocolo A68A2BA. Após secas ao ar ($28 \pm 2^\circ \text{C}$; 5 dias), as folhas foram trituradas e misturadas com NaCl 0,15M (na proporção de 9:1, p/v) durante 16 h, utilizando um agitador magnético. Em seguida, a mistura foi submetida à filtração em gaze, e o filtrado foi centrifugado (3000g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi denominado extrato salino (ES).

2.3 Determinação da concentração mínima inibitória e mínima bactericida:

Para determinar a concentração mínima inibitória (CMI) das amostras foi realizado o ensaio de microdiluição proposto pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI, 2018). A amostra (80 µL; 0,57 mg) foi adicionada em placas de microtitulação de 96 poços, no terceiro e quarto poço a partir do qual foi diluída seriadamente em água destilada estéril até o décimo segundo poço da mesma

fileira. Posteriormente, 40 µL do meio caldo Mueller Hinton foram adicionados em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 µl do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. A suspensão bacteriana (80 µl; 3×10^6 UFC/ml) foram acrescentadas do segundo poço até o último poço da fileira. O segundo poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 37°C e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. A concentração mínima inibitória (CMI) correspondeu a menor concentração da amostra capaz de promover a redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%.

Para a determinação da CMB, alíquotas (10 µl) dos poços contendo concentrações das amostras $\geq$ CMI foram inoculados em placas de petri contendo meio Agar Mueller Hinton, que foram posteriormente incubados a 37 °C por 24h. A CMB correspondeu a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

2.4 Curvas de crescimento

Curvas de crescimento foram estabelecidas durante 24 horas para monitorar do comportamento celular de isolados de mastite na ausência ou na presença do ES em diferentes concentrações (1/4 CMI; 1/2 CMI, CMI, 2x CMI e 4x CMI). O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços como descrito na seção anterior. O primeiro poço correspondeu ao controle de esterilidade, o segundo poço correspondeu ao controle de crescimento de 100% e do terceiro ao sétimo poço corresponderam aos tratamentos com o ES. A microplaca foi incubada a 37 °C e a DO_{600} foi determinada a cada hora. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

2.5 Ensaio antibiofilme

A capacidade do ES em prevenir ou reduzir a formação de biofilme foi determinada com base no método do cristal violeta (Trentin et al., 2011). O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços de poliestireno estéreis, nos quais foram adicionados em cada poço, 80 µL de suspensão microbiana (10^8 UFC/mL em NaCl 0,15 M), 80 µL do ES (nas concentrações finais de 7,03-1800µg/mL) em água Milli-

Q e 40 µL de MHB. Para o controle de células não tratadas (100% de crescimento do biofilme) ES foi substituído por água Milli-Q. A DO₆₀₀ foi registrada no início do experimento e a microplaca foi incubada a 37°. O crescimento bacteriano foi avaliado pelo aumento da DO₆₀₀ após 24h de incubação. Em seguida, as células não aderentes foram removidas dos poços após três lavagens com NaCl 0,15 M. Os biofilmes foram pré-fixados com metanol absoluto durante 30 min a 50° C. Então o biofilme foi corado com cristal violeta 0,4% (p/v) durante 25 min em 25° C. O cristal violeta não ligado foi removido com água destilada e o corante ligado ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto por 15 min, e a absorbância foi medida a 570 nm.

2.6 Sinergismo

Os efeitos sinérgicos entre o ES e os antibióticos carbapenema e cephalexina foram avaliados utilizando o método descrito por Pilai et al (2005). Cada experimento correspondeu a duas fileiras de uma microplaca de 96 poços. O primeiro poço correspondeu ao controle de esterilidade e continha 200 µL de meio de cultura. O segundo poço correspondeu ao controle de crescimento 100%. ES foi adicionado (80 µL; 0,57 mg) ao quarto poço da primeira linha e diluição seriada em água Milli-Q estéril foi realizada até o penúltimo poço da segunda linha. Em seguida, 80 µl do antibiótico em decrescentes concentrações foram adicionados do penúltimo poço da segunda linha até o quarto poço da primeira fila. O terceiro poço da primeira linha continha apenas ES (80 µl, 4×CMI) e o último poço do segundo a segunda linha continha apenas antibiótico (80 µl, 200µg/mL). Cada poço, exceto o primeiro, foi inoculado com suspensão (80 µL a 3×10^6 CFU/mL) e incubada a 37 ° C. O experimento foi seguido pela medição do OD 600 no tempo zero e após 24 h. A avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi realizada através da determinação do Índice de concentração inibitória fracionária (Σ FIC), como segue: Σ FIC = (MIC do ES em combinação / MIC de ES sozinho) + (MIC do antibiótico em combinação / MIC do antibiótico sozinho). As combinações foram classificadas como sinérgicas (Σ FIC ≤ 0,5), aditiva (Σ FIC 0.5-1.0), indiferente (Σ FIC 1.0 – ≤ 4.0) ou antagonista (Σ FIC >4.0).

2.7 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como a média ou a média percentual $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos independentes realizados em triplicatas. ANOVA unilateral (significância em $p < 0,05$) foi conduzida usando Graphpad Prism 8. As diferenças significativas entre os grupos de tratamento foram analisadas e as diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste de intervalo de Tukey; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base em estudos que apontam o potencial antimicrobiano de produtos de origem vegetal e sua possível utilização no tratamento de infecções, este trabalho foi conduzido para testar a hipótese de que o extrato de folhas de *S. terebinthifolia* prejudica o crescimento, a sobrevivência e a formação de biofilmes por bactérias isoladas de mastite caprina (GOMES et al., 2019; ABDI; DEGO et al, 2019).

Quando ES foi submetido à investigação da presença de lectina, uma AH específica de 44,61 foi revelada, confirmando a presença de SteLL, enquanto a avaliação do potencial antimicrobiano mostrou ES como um agente bacteriostático contra os isolados causadores de mastite caprina Sa24, Sa32, Ssp1 e Ssp2. Os valores de CMI estão apresentados na Tabela 2 e variam de 225 a 1800 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, ES não exerceu efeito bactericida sobre as espécies testadas.

ES foi obtido através do mesmo protocolo previamente reportado em trabalhos que mostraram que o extrato contém uma lectina ligadora de quitina glicosilada e íon dependente com 14 kDa de massa molecular, além de proantocianidinas poliméricas, taninos hidrolisáveis, flavonóides heterosídeos e agliconas, derivados do ácido cinâmico, bem como traços de esteroides (GOMES et al., 2013; PROCÓPIO et al., 2015; SANTOS et al., 2022). É possível que estes metabólitos secundários ou SteLL estejam envolvidos na ação antibacteriana de ES, uma vez que estudos têm relatado efeitos deletérios dessas classes de compostos para outras bactérias (GOMES et al., 2013; RUWIZHI; ADERIBIGBE, 2020; ALLEMAILEM, 2021).

Diferentes mecanismos já foram relatados para a atividade antibacteriana dos antibióticos naturais, tais como inibição de enzimas e toxinas, bloqueio da síntese da parede celular, ruptura da membrana bacteriana, entre outros (FARHA

et al., 2020; BIHARIEE et al., 2020). A eficiência antibacteriana de ES contra *Staphylococcus* sp. e *S. aureus* causadores de mastite em cabras foi similar àquela reportada para os óleos essenciais das plantas: *Lippia origanoides* (alecrim-pimenta), *Lippia alba* (erva cidreira) e *Cymbopogon citratus* (capim-santo) com CMI de 560, 1173 e 1280 µg/mL, respectivamente (FURLANI et al., 2020).

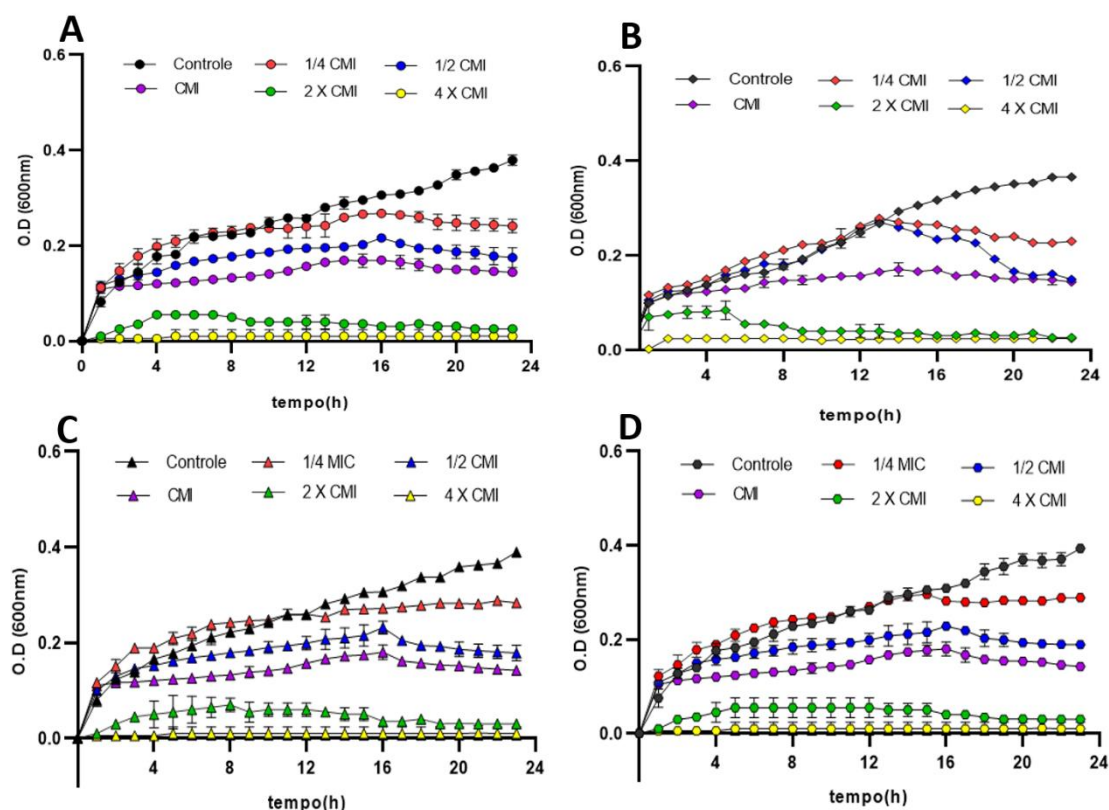
Tabela1: Concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB) do extrato salino de *Schinus terebinthifolia* (ES) frente a espécies de *Staphylococcus* causadoras de mastite.

Bactéria	ES	
	CMI	CMB
<i>S.aureus</i> 24 (Sa24)	1800	ND
<i>S.aureus</i> 32 (Sa32)	900	ND
<i>Staphylococcus</i> sp.(Ssp1)	450	ND
<i>Staphylococcus</i> sp. (Ssp2)	225	ND

CMI e CMB expressos em µg/ml. ND: não detectado.

Uma vez que ES apresentou efeito bacteriostático, a cinética de crescimento bacteriano foi investigada, e as curvas de crescimento (Figura 1) indicaram que ES a $\frac{1}{4}$ CMI mostrou efeito semelhantes em todas as linhagens testadas, com crescimento maior que o controle no início do experimento e uma gradual redução entre 12 e 16 h. Por outro lado, ES a $\frac{1}{2}$ CMI acarretou menor crescimento comparado ao controle, exceto para Sa 32, que apresentou crescimento maior ou igual ao controle até a 13^a h. Quando avaliado em concentração equivalente à CMI, ES prejudicou o crescimento das colônias de bactérias desde as primeiras horas de incubação, e esse achado se manteve constante até o fim do experimento. Como esperado, ES nas concentrações equivalentes a 2xCMI e 4xCMI não foi detectado crescimento bacteriano em nenhuma das cepas, até o final do experimento.

Figura 1: Curvas de crescimento (24 h) de *S. aureus* 24 (A), *S. aureus* 32 (B), *Staphylococcus* sp. 1 (C) e *Staphylococcus* sp. 2 (D) na ausência (controle negativo) ou presença do extrato salino de *Schinus terebinthifolia* em diferentes concentrações. Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (SD) de três experimentos.



Outros estudos avaliaram a cinética de ação bacteriostática de compostos vegetais para isolados de mastite caprina. A lectina dos folíolos das folhas de *Caliandra surinamensis* - CasuL, em combinação com o antibiótico tetraciclina, reduziu o crescimento de *Staphylococcus aureus* após 4 h de exposição (PROCÓPIO et al., 2019).

A habilidade das espécies causadoras de mastite formar biofilmes lhes permite aderir e persistir na glândula mamária aumentando a resistência à terapia antibiótica, o que consequentemente reduz a possibilidade de erradicar infecções (CHENG et al., 2020). Os biofilmes são agregados microbianos complexos envolvidos por uma matriz polimérica extracelular capazes de aderir a superfícies vivas ou inertes. São considerados fator de virulência bacteriano que oferece vantagens adaptativas ao proteger as bactérias dos mecanismos de defesa do hospedeiro (ZHANG et al., 2020). Alguns autores têm considerado que o uso de

extratos vegetais como agentes antibiofilmes, dada sua origem natural, é seguro (FRASSINETI et al., 2020).

Quando ES foi avaliado quanto ao efeito antibiofilme, foi observada inibição significativa da formação de biofilme pelo isolado Sa32 entre as concentrações de 225 a 1800 µg/mL. Por outro lado, os isolados Sa24, Ssp1 e Ssp2 foram menos sensíveis a este efeito, uma vez que a inibição da formação de biofilmes ocorreu a partir da concentração de 450 µg/mL (Figura 2). Contudo, ES não foi capaz de destruir biofilmes pré-formados (Figura 3).

Outros extratos de plantas têm sido avaliados quanto à atividade antibiofilme contra causadores de mastite. Extratos de *Hymenaea martiana* reduziram a produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. isolados de mastite subclínica em cabras (PEIXOTO, et al., 2020). O extrato hexânico de *Croton urucurana* inibiu a formação (88,94%) e erradicou (50,03%) biofilmes pré-formados de *S. aureus* isoladas de leite de vacas portadoras de mastite (NADER et al., 2018). O efeito antibiofilme dos extratos vegetais pode resultar da interação entre seus constituintes e receptores de adesão celular, levando à formação de poros na membrana e ao desequilíbrio do potencial transmembrana (LAHIRI et al., 2019). Além disso, pode ocorrer inibição do processo de sinalização coletiva realizado pelas células bacterianas, denominado de QS, crucial para a formação de biofilme (SILVA et al., 2016).

Figura 2: Formação de biofilme de *S. aureus* 24 (A), *S. aureus* 32 (B), *Staphylococcus* sp. 1 (C) e *Staphylococcus* sp. 2 (D) na ausência (controle negativo) ou na presença do extrato salino de *Schinus terebinthifolia*. A formação de biofilme foi avaliada pelo método de cristal violeta e pela medição da densidade óptica a 570 nm. Coluna azul corresponde a crescimento bacteriano e coluna vermelha a formação de biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o controle negativo.

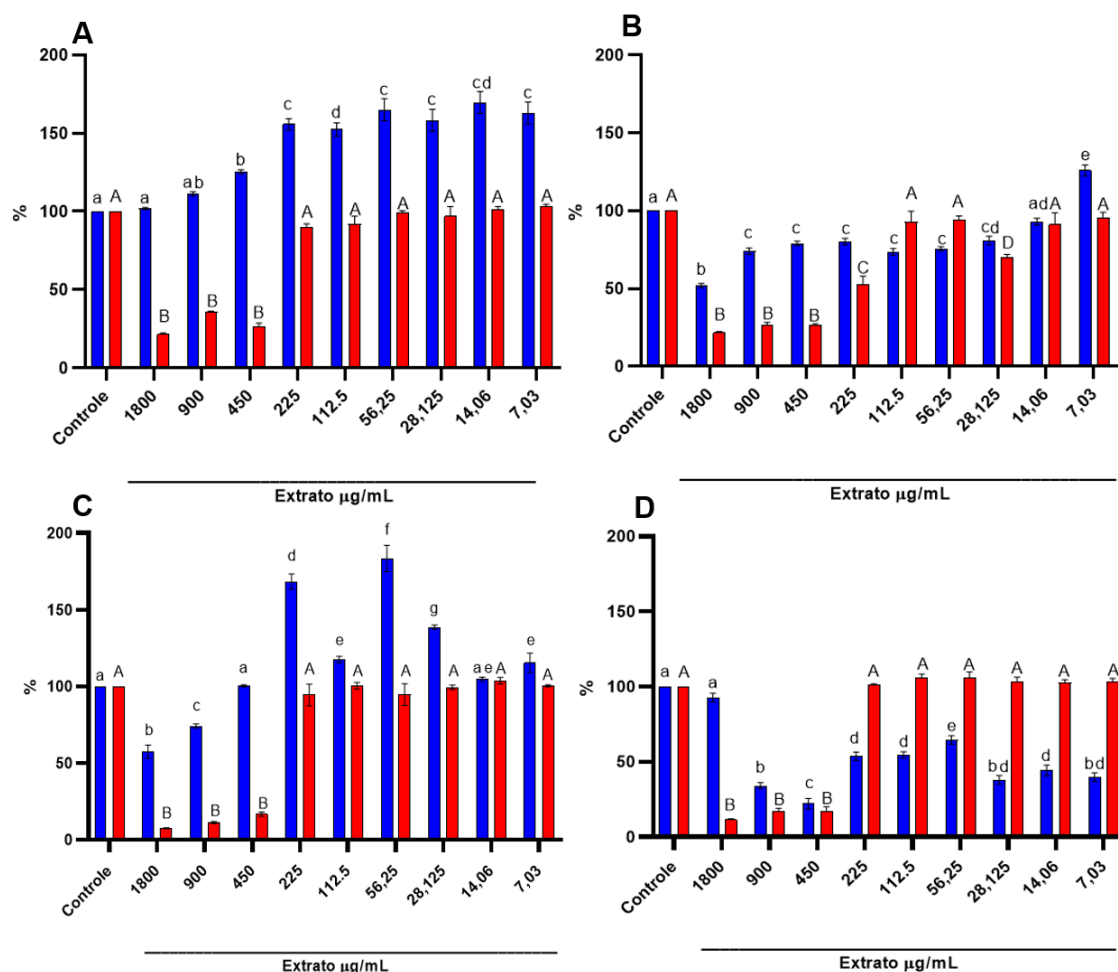
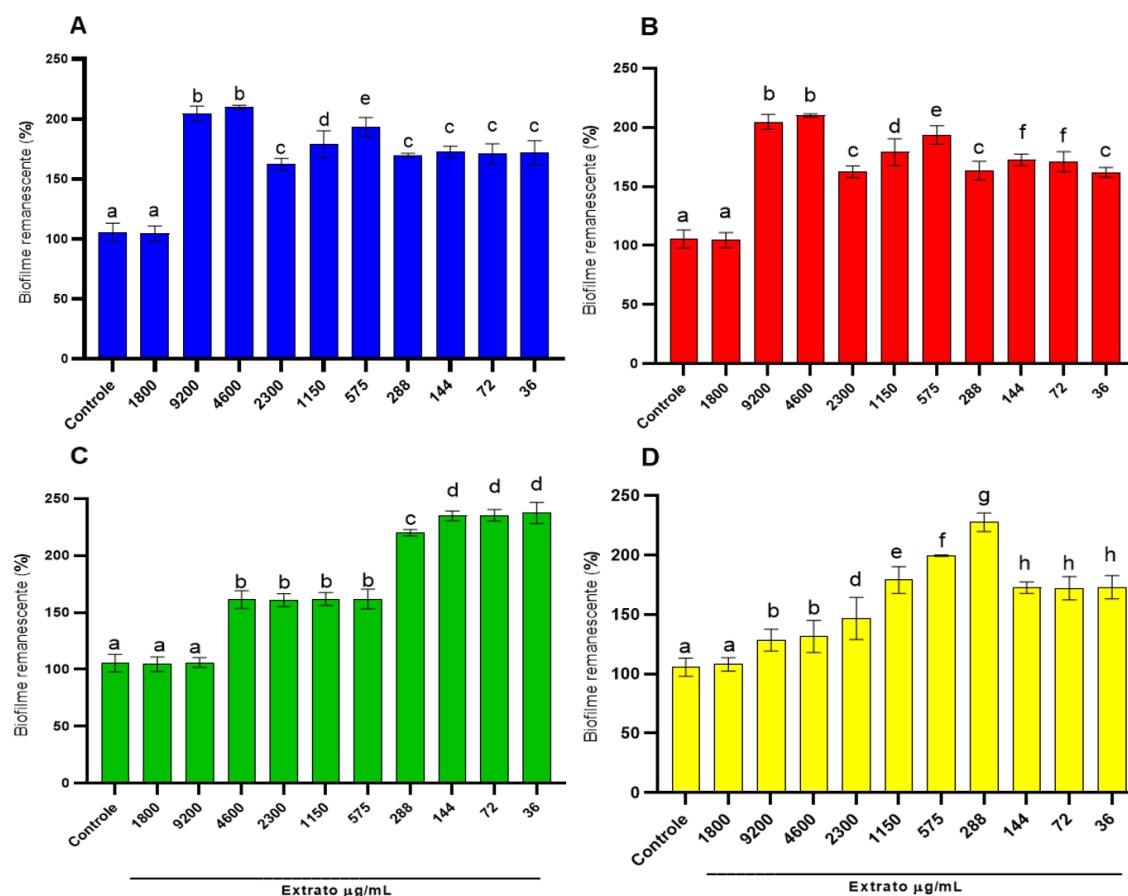


Figura 3: Efeito do extrato salino de *Schinus terebinthifolia* sobre biofilmes pré-formados de cepas de *S. aureus* 24 (A), *S. aureus* 32 (B), *Staphylococcus* sp. 1 (C) e *Staphylococcus* sp. 2 (D). Os valores obtidos para o biofilme não tratado (controle não tratado) corresponderam a 100% da biomassa do biofilme. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.



Por causa dos seus efeitos deletérios frente aos isolados de mastite, este trabalho hipotetizou que ES poderia apresentar efeito sinérgico quando combinado com antibióticos padrão (cefalexina e carbapenema). Os resultados confirmaram esta hipótese ao revelar valores de Σ FIC menores que 0,5 (Tabela 2), caracterizando o efeito sinérgico da combinação para todos os isolados. Este é um resultado interessante, pois ao acarretar a redução dos valores de CMI dos antibióticos, a combinação com ES pode reduzir os seus efeitos adversos.

A terapia combinada é uma abordagem alternativa promissora para aumentar o espectro de ação antibacteriana sobre patógenos resistentes. Esta terapia compreende a combinação de duas ou mais drogas visando alcançar um efeito maior do que a adição dos efeitos individuais (SANTOS; PORTO;

CAVALCANTI, 2021). Assim, pesquisas que investigam o potencial da combinação de antibióticos com antimicrobianos vegetais têm sido realizadas com o objetivo de apontar novas estratégias terapêuticas para tratamento de mastite (MAIA et al., 2018; BULDAIN et al., 2020). O extrato etanólico de *Ocimum tenuiflorum*, exibiu efeito sinérgico quando combinado com os antibióticos penicilina ou amoxicilina-ácido clavulânico, bem como efeito aditivo com Cefazolina e Gentamicina contra patógenos importantes para a mastite (SRICHOCK et al., 2022).

Tabela 2: Avaliação da atividade antibacteriana do extrato salino de *Schinus terebinthifolia* e drogas padrão (separados ou em combinação) contra espécies de *Staphylococcus* causadoras de mastite.

Bactéria	Avaliação					
	CMI		CMI em combinação		ΣCIF	Efeito da combinação
	Extrato	Antibiótico	Extrato	Antibiótico		
S. aureus 24 (Sa24)	1800	Cephalexina		Cephalexina		
		16	0,44	0,62	0,039	Sinergismo
		Carbapenema		Carbapenema		
		8	0,11	2,5	0,312	Sinergismo
S. aureus 32 (Sa32)	900	Cephalexina		Cephalexina		
		16	14,06	0,019	0,016	Sinergismo
		Carbapenema		Carbapenema		
		8	112,5	0,002	0,125	Sinergismo
Staphylococcus sp. (Ssp1)	450	Cephalexina		Cephalexina		
		16	0,88	0,31	0,021	Sinergismo
		Carbapenema		Carbapenema		
		8	28	0,009	0,063	Sinergismo
Staphylococcus sp. (Ssp2)	225	Cephalexina		Cephalexina		
		16	1,76	0,16	0,017	Sinergismo
		Carbapenema		Carbapenema		
		8	3,51	0,078	0,025	Sinergismo

4. CONCLUSÃO

O extrato salino de *S. terebinthifolia* é um agente antimicrobiano contra espécies de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina por inibir o crescimento

bacteriano e a formação de biofilmes, além de atuar de modo sinérgico em combinação com antibióticos padrão. Os achados relatados aqui estimulam estudos sobre a toxicidade do extrato em animais leiteiros a fim de utilizá-lo de forma segura.

REFERÊNCIAS

ABDALHAMED, A. M.; ZEEDAN, G. S. G.; ABOU ZEINA, H. A. A. Isolation and identification of bacteria causing mastitis in small ruminants and their susceptibility to antibiotics, honey, essential oils, and plant extracts. **Veterinary World**, v. 11, n. 3, p. 355–362, mar. 2018.

ABDI, R. D.; DEGO, O. Antimicrobial activity of *Persicaria pensylvanica* extract against *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 29, p. 100921, ago. 2019

AKKOU, M. et al. Phenotypic characterization of Staphylococci causing mastitis in goats and microarray-based genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates. **Small Ruminant Research**, v. 169, p. 29–33, dez. 2018.

ALLEMAILEM, K. S. Antimicrobial Potential of Naturally Occurring Bioactive Secondary Metabolites. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 13, n. 2, p. 155–162, jun. 2021.

AMARANTE, J. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. and multiresistant bacteria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 734–743, set. 2019.

ARAGÃO, B. B. et al. Multiresistant zoonotic pathogens isolated from goat milk in Northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 79, p. 101701, dez. 2021

BIHAREE, A. et al. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104720, out. 2020.

BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with Aldehyde-Fixed Erythrocytes for Assay of Antigens and Antibodies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 4, p. 1166–1170, 1 abr. 1967.

BULDAIN, D. et al. *Melaleuca armillaris* Essential Oil in Combination With Rifaximin Against *Staphylococcus aureus* Isolated of Dairy Cows. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 344, 15 jul. 2020.

CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 81–89, jun. 2018.

CARMINATE, B. et al. ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DOS EXTRATOS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 485, 7 fev. 2017.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 1, p. 158–169, 2013.

CHENG, W. N.; HAN, S. G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 33, n. 11, p. 1699–1713, 1 nov. 2020.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th Edition, CLSI guideline M07.

COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLAMA, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2212, 26 nov. 2020.

FALCÃO, M. P. M. M. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 23, 9 dez. 2015.

FARHA, A. K. et al. Tannins as an alternative to antibiotics. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100751, dez. 2020.

FEDEL-MIYASATO, L. E. S. et al. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 5, p. 565–575, set. 2014.

FRASSINETTI, S. et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. **LWT**, v. 124, p. 109149, abr. 2020.

FURLANI, R. et al. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST PATHOGENS OF IMPORTANCE IN CAPRINE AND OVINE MASTITIS. **Revista Caatinga**, v. 34, n. 3, p. 702–708, set. 2021.

GOMES, F. et al. Anti-biofilm activity of hydromethanolic plant extracts against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01728, maio 2019.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672–679, mar. 2013.

KIM, G. et al. Bactericidal and antibiofilm properties of *Rumex japonicus* Houtt. on multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 3, p. 2011–2024, mar. 2022.

KLHAR, G. T. et al. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of propolis against bacteria that cause mastitis in cattle. **Biotemas**, v. 32, n. 1, p. 1–10, 25 fev. 2019.

LAHIRI, D. et al. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 2, p. 52, jun. 2019.

LEITE, L. O. et al. On-farm welfare assessment in dairy goats in the Brazilian Northeast. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 6, p. 2308–2320, dez. 2020.

LU, C. D.; MILLER, B. A. Current status, challenges and prospects for dairy goat production in the Americas. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, n. 8, p. 1244–1255, 1 ago. 2019.

MACHADO ET AL., M. mastitis-in-small-ruminants. **Animal Husbandry, Dairy and Veterinary Science**, v. 2, n. 4, 2018.

MAIA, N. L. et al. Synergism of Plant Compound With Traditional Antimicrobials Against *Streptococcus* spp. Isolated From Bovine Mastitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1203, 6 jun. 2018.

MILES, A. M.; HUSON, H. J. Graduate Student Literature Review: Understanding the genetic mechanisms underlying mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, p. 1183–1191, jan. 2021.

MILLER, B. A.; LU, C. D. Current status of global dairy goat production: an overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, n. 8, p. 1219–1232, 1 ago. 2019.

NADER, T. T. et al. Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1713–1719, set. 2018.

PAŞCA, C. et al. Efficacy of natural formulations in bovine mastitis pathology: alternative solution to antibiotic treatment. **Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 4, p. 523–529, 20 out. 2020.

PEIXOTO, R.M. et al. Molecular characterization, biofilm production and sensitivity to the natural extract of *Staphylococcus* spp. from subclinical mastitis in goats. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, n. 7, p. 309–318, 31 jul. 2020.

PILLAI, S.K., Moellering, R.C. and Eliopoulos, G.M. (2005) Antimicrobial Combinations. In: Lorian, V., Ed., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th Edition, the Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, 365-440

PROCÓPIO, T. F. et al. Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: Evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics. **Microbiology Open**, v. 8, n. 11, nov. 2019.

PROCÓPIO, T. F. et al. *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 14 maio 2015.

ROSAS, E. C. et al. Anti-inflammatory effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi hydroalcoholic extract on neutrophil migration in zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 490–498, dez. 2015.

RUWIZHI, N.; ADERIBIGBE, B. A. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5712, 9 ago. 2020.

SALABERRY, S. R. S. et al. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 85, p. 35–39, ago. 2015.

SANTOS, J. V. DE O.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, I. M. F. Potential Application of Combined Therapy with Lectins as a Therapeutic Strategy for the Treatment of Bacterial Infections. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 520, 2 maio 2021.

SILVA, L. N. et al. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 16, p. 9162–9236, 24 ago. 2016.

SILVA, P. R. C. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf extract is a larvicidal, pupicidal, and oviposition deterring agent against *Plutella xylostella*. **South African Journal of Botany**, v. 127, p. 124–128, dez. 2019.

SOUZA, B. C. DA S. et al. Economic impact and epidemiological aspects of subclinical mastitis and caprine arthritis-encephalitis in the semiarid northeastern region of Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, n. 4, p. 310–315, 5 out. 2021.

SRICHOK, J. et al. Synergistic Antibacterial and Anti-inflammatory Activities of *Ocimum tenuiflorum* Ethanolic Extract against Major Bacterial Mastitis Pathogens. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, p. 510, 12 abr. 2022.

TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 327–335, 2011.

ZHANG, K. et al. Promising Therapeutic Strategies Against Microbial Biofilm Challenges. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 359, 28 jul. 2020.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA LECTINA DE FOLHAS DE *Schinus terebinthifolia* Raddi SOBRE *Staphylococcus aureus*

Talyta Naldeska da Silva^a, Gustavo Ramos Salles Ferreira^b, Maiara Celine de Moura^b, Patrícia Maria Guedes Paiva^b, Thiago Henrique Napoleão^b, Pollyanna Michelle da Silva^b, Emmanuel Viana Pontual^{a,*}

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

Resumo: *Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica causadora de infecções, principalmente no ambiente hospitalar. Sua habilidade em formar biofilmes, comunidades microbianas complexas, é um fator determinante de sua virulência e contribui fortemente para a resistência microbiana. Nesse sentido, tem crescido a busca por compostos de origem natural com atividade antimicrobiana que sejam mais efetivos e menos tóxicos para células do hospedeiro. SteLL é uma lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae) com ação antimicrobiana previamente relatada. Aqui o potencial antibacteriano e antibiofilme de SteLL contra isolados de *Staphylococcus aureus*, sensível (UFPEDA 02) e resistente a oxacilina (UFPEDA 670) é reportado. SteLL foi agente bacteriostático e bactericida para os isolados UFPEDA 02 e UFPEDA 670 com CMI de 12,5 e 25 µg/mL e CMB de 50 e 100 µg/mL, respectivamente. A cinética de crescimento das células tratadas com SteLL revelou que houve inibição do crescimento de forma dose-dependente. SteLL causou alterações relacionadas a tamanho e complexidade nas células de *S. aureus* e inibiu a formação de biofilme de UFPEDA 02 nas concentrações entre 25 e 400 µg/mL e de UFPEDA 670 entre 100 e 400 µg/mL. Em conclusão, SteLL é um agente antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* por inibir o crescimento, promover morte celular e inibir a formação de biofilme bacteriano.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais, biofilme, lectina, microrganismo resistente, aroeira.

1 INTRODUÇÃO

A crescente disseminação de microrganismos resistentes se tornou um problema de saúde pública de proporção global e este fenômeno está associado ao uso extensivo de antimicrobianos (HU; LOGUE; ROBINSON, 2020). No que se refere às bactérias, o dinamismo de sua biologia, que abrange uma plasticidade genética e alta taxa de reprodução, impulsiona o contínuo surgimento e aquisição de novos mecanismos que lhes permitem sobreviver à exposição aos antibióticos (ASENJO; OTEO-IGLESIAS; ALÓS, 2021). Os impactos de infecções causadas por bactérias resistentes em comparação às adquiridas por microrganismos suscetíveis compreendem uma maior morbidade e mortalidade dos pacientes, aumento no tempo de permanência hospitalar e nos custos de tratamento (ABUSHAHEEN et al., 2020).

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica altamente relevante para a ocorrência de doenças infecciosas, sendo uma das principais causas de endocardite, osteomielite, infecções na pele e tecidos moles e infecções relacionadas a dispositivos (TONG et al., 2015). Esta espécie é conhecida por adquirir resistência aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos, como por exemplo a oxacilina, através de mecanismos mediados pela enzima β -lactamase e por Proteínas de ligação à Penicilina, representando um desafio para a antibioticoterapia (COSTA et al., 2018). Além da resistência, *S. aureus* produz fatores de virulência que elevam sua patogenicidade e auxiliam na evasão do sistema imune do hospedeiro, entre estes fatores destaca-se a formação de biofilme (PARASTAN et al., 2020).

Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos inseridos em uma matriz polimérica extracelular, composta de exopolissacarídeos, proteínas, ácidos teicóicos, enzimas e DNA extracelular (YIN et al., 2019). A formação de biofilme representa uma vantagem adaptativa pelo fato de conferir uma maior proteção às células microbianas, permitindo o seu crescimento e sobrevivência nos mais variados ambientes, sejam eles bióticos ou abióticos (SANTOS et al., 2018). Infecções associadas a biofilmes formados por *S. aureus* impõem desafios terapêuticos notáveis em clínicas em todo o mundo, por isso a busca por métodos alternativos de controle têm se intensificado (SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

Lectinas são proteínas que possuem origem não imune com capacidade de se ligar a carboidratos de forma específica e reversível e estão distribuídas amplamente em toda a natureza (COELHO et al., 2018). As lectinas vegetais exibem uma grande variedade de atividades biológicas, entre elas, atividade antimicrobiana (MOURA et al., 2021; SILVA et al., 2019). A ação antimicrobiana destas moléculas resulta do reconhecimento e ligação a carboidratos presentes na superfície celular dos microorganismos. Os principais mecanismos envolvidos na atividade antibacteriana e antibiofilme das lectinas incluem formação de poros que causam alterações na permeabilização da membrana bacteriana e interferência no sistema de sinalização *quorum sensing*, diminuindo a expressão de genes necessários para o desenvolvimento do biofilme (PROCÓPIO et al., 2017; COELHO et al., 2018).

SteLL é uma lectina isolada de folhas de *Schinus terebinthifolia* (Anarcadiaceae), uma planta nativa da costa brasileira conhecida por suas propriedades terapêuticas na medicina popular (FALCÃO et al., 2015). É uma lectina capaz de se ligar a quitina, com massa molecular de 14kDa e é termoestável (GOMES et al., 2013). Estudos anteriores revelaram que SteLL possui uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo, atividade antibacteriana e antifúngica contra patógenos de interesse médico, efeitos antinutricionais em adultos de *Sitophilus zeamais*, atividade antitumoral contra sarcoma 180, atividade imunomoduladora em macrófagos infectados e esplenócitos de camundongos (CAMAROTI et al., 2018; RAMOS et al., 2019; LIMA et al., 2019; SANTOS et al., 2020; GOMES et al., 2013).

Com base na utilização de *S. terebinthifolia* na medicina popular para diversos fins e no reconhecido potencial biotecnológico da lectina isolada de suas folhas, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano de SteLL, no crescimento e sobrevivência de cepas de *Staphylococcus aureus* sensível ou resistente à Oxacilina. Em adição, investigamos o efeito da lectina na formação e erradicação de biofilmes destas cepas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens bacterianas, condições de cultivo e preparação das amostras

Neste estudo foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* sensível e resistente a oxacilina (UFPEDA-02 e UFPEDA-670, respectivamente), fornecidas pela coleção de cultura (WDCM 114) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. As bactérias foram mantidas em Caldo Mueller Hinton contendo glicerol 10% (v/v) a 20°C. Para realização dos experimentos, as bactérias foram cultivadas em meio agar Mueller Hinton *overnight* a 37°C. Em seguida, as colônias foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,15M) e ajustadas turbidimetricamente a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) para a obtenção de suspensão bacteriana de 3×10^6 UFC/mL. Para o ensaio, as amostras foram filtradas em filtro de seringa PVDF 13 mm x 0,22 µm estéreis.

2.2 Preparação do extrato e isolamento da lectina

As folhas foram coletadas na Universidade Federal Rural de Pernambuco, município de Recife (Pernambuco, Brasil), com autorização (36.301) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) do Ministério do Meio Ambiente. O acesso ao material vegetal foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob o protocolo A68A2BA. As folhas foram trituradas e, em seguida, misturada com NaCl 0,15M (na proporção de 9:1, p/v) durante 16 h, utilizando um agitador magnético. A mistura foi então submetida a filtração através de gaze, e o filtrado foi centrifugado (3000g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi denominado extrato salino (ES). STeLL foi isolada de folhas de *S. terebinthifolia*, conforme descrito por Gomes et al. (2013). O ES foi aplicado a coluna de quitina (Sigma-Aldrich, EUA) (7,5 x 1,5 cm) equilibrada com NaCl 0,15 M e a lectina STeLL adsorvida foi recuperada por eluição com ácido acético 1,0 M e dialisada contra água destilada (6h, 4°C) para remoção do eluente.

2.3 Concentração de proteínas e atividade hemaglutinante (AH)

A concentração de proteína foi determinada de acordo com Lowry et al. (1951) usando albumina sérica bovina (31,25-500 µg/mL) como padrão. A AH foi determinada como descrito por Silva et al. (2016) usando suspensão de eritrócitos de coelho (2,5% v/v) previamente tratados com glutaraldeído (BING; WEYAND; STAVITSKY, 1967) A coleta de eritrócitos foi aprovada pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo 23076.033782 / 2015-70). No ensaio de AH, STeLL (50 μ L) foi diluída serialmente em NaCl 0,15 M em uma linha de microplaca de 96 poços com fundo em V, e em seguida a suspensão de eritrócitos (50 μ L) foi adicionada em cada poço; no controle negativo, os eritrócitos foram incubados com NaCl 0,15 M. Após incubação durante 45 min a 28°C, o número de unidades de AH (UAH) foi determinado como da maior diluição da amostra que promoveu a aglutinação total dos eritrócitos de coelho. A AH específica foi definida como a razão entre o UAH e a concentração de proteína (mg/mL).

2.4 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e mínima bactericida (CMB)

A CMI das amostras foi determinada pelo ensaio de microtitulação proposto pelo Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (CLSI, 2018). Em placas de microtitulação de 96 poços, a amostra foi adicionada (80 μ L) no terceiro e quarto poço a partir do qual foi diluída seriadamente em água destilada estéril até o décimo segundo poço da mesma fileira. Posteriormente, 40 μ L do meio caldo Mueller Hinton foram adicionados em todos os poços, exceto no primeiro, que foi preenchido com 200 μ L do meio de cultura, correspondendo ao controle de esterilidade. A suspensão bacteriana (80 μ L; 3×10^6 UFC/ml) foram acrescentadas do segundo poço até o último poço da fileira. O segundo poço (que contém microrganismos na ausência da amostra) correspondeu ao controle de crescimento de 100%. As placas foram incubadas a 37°C ou 30°C e a densidade óptica foi medida no tempo zero e após 24 h de incubação usando um leitor de microplacas. A concentração mínima inibitória (CMI) correspondeu a menor concentração da amostra capaz de promover a redução $\geq 50\%$ na densidade óptica, em comparação ao controle de crescimento 100%.

Para a determinação da CMB, alíquotas (10 μ L) dos poços contendo concentrações das amostras $\geq$ CMI foram inoculados em placas de petri contendo meio agar Mueller Hinton, que foram posteriormente incubados a 37 °C por 24h. O CMB/CMF correspondeu a menor concentração da amostra capaz de reduzir o número de UFC em 99,9% em relação ao inóculo inicial. Cada ensaio foi realizado em triplicata e três experimentos independentes foram realizados.

2.5 Curvas de crescimento de *S. aureus* sensíveis ou resistentes à oxacilina

Para monitoramento do crescimento celular bacteriano na presença ou na ausência de SteLL foram estabelecidas curvas de crescimento durante 20 h. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços como descrito na seção 2.4. O primeiro poço correspondeu ao controle de esterilidade, o segundo poço correspondeu ao controle de crescimento de 100% e do terceiro ao quinto poço corresponderam a tratamentos com SteLL a 2×CMI, CMI e ½CMI, respectivamente. A microplaca foi incubada a 37 °C e a DO₆₀₀ foi determinada a cada hora. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

2.6 Análise da viabilidade bacteriana por citometria de fluxo

A viabilidade de células bacterianas tratadas com SteLL foi avaliada utilizando o Kit Cell Viability da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA). As bactérias foram incubadas conforme descrito na seção 2.4 com SteLL na CMI. O controle negativo foi preparado adicionando água destilada em substituição de SteLL. Para o controle positivo, as células foram tratadas com álcool isopropílico a 70% (v/v) durante 1 h antes da análise. As amostras foram centrifugadas (10.000 x g, 10 min, 25°C) e os *pellets* contendo as células foram lavados três vezes com PBS 0,1 M em pH 7,2. Em seguida, 42 µM de laranja de tiazol (OT, 5 µL) e iodeto de propídio 4,3 µM (PI, 5 µL) foram adicionados às amostras, as quais foram submetidas a vórtex e incubadas por 5 min a 25 °C. Os dados foram obtidos em um citômetro BD Accuri C6 (BD Biosciences) com um limiar de SSC de 200 e interrompido após a propagação de 20.000 eventos para cada amostra. A análise foi realizada no software BD Accuri C6. Os resultados foram apresentados como gráficos de pontos FL1 vs. FL3 e a fluorescência da média FL3 (coloração PI).

2.7 Formação de biofilmes bacterianos mono e multicepas

A formação do biofilme de *S. aureus* foi avaliada utilizando-se o método do cristal violeta. Para biofilmes das cepas estudadas foi estabelecido o protocolo de formação com a escolha do melhor meio de cultura, dentre os caldos Mueller Hinton (MH), Triptona de Soja (TSB) e Infusão Cérebro-Coração (BHI), suplementados ou não com 1% de glicose. Em placas de microtitulação de poliestireno de fundo chato cada poço foi adicionado 80 µl de água Milli-Q, 40 µl do meio de cultura líquido e 80 µl da suspensão bacteriana (10⁸ UFC/ml; em

solução salina estéril), de um ou mais inóculos bacterianos, para o desenvolvimento de biofilmes mono e multicepas, respectivamente. A DO_{600} foi obtida no tempo zero, as placas foram incubadas a 37 °C por 24h e, após esse período, a DO_{600} foi obtida novamente a fim de se verificar o crescimento bacteriano. A etapa seguinte correspondeu à análise da formação do biofilme que ocorre após a remoção do conteúdo (células não aderidas) de cada poço da placa. Adicionalmente, os poços foram lavados com NaCl a 0,9 % estéril (três vezes) e os biofilmes (células aderidas à placa de poliestireno) foram incubados a 60°C por 60 min para fixação e, em seguida, marcados com cristal violeta 0,4% (p/v) por 15 min a 25°C. Os poços foram lavados com água para remoção do cristal violeta não aderido e, posteriormente, o corante aderido ao biofilme foi solubilizado em etanol absoluto (15 min) e a absorbância a 570 nm foi mensurada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Em cada caso, o melhor meio de cultura para crescimento do biofilme foi escolhido para os próximos experimentos.

2.8 Ensaio antibiofilme

A formação de biofilme foi avaliada em microplacas de 96 poços de poliestireno estéreis pelo método do cristal violeta (Trentin et al., 2011). Em cada poço do teste foram adicionados, 80 µL de suspensão microbiana (10^8 UFC/mL em NaCl 0,15 M), 80 µL de SteLL (nas concentrações finais de 200-1,56µg/mL) em água Milli-Q e 40 µL de MHB. Para o controle de células não tratadas (100% de crescimento do biofilme) SteLL foi substituída por água Milli-Q. O crescimento bacteriano foi avaliado pelo aumento da DO_{600} após 24h de incubação a 37° C. Em seguida, as células não aderentes foram removidas dos poços após três lavagens com NaCl 0,15 M. Os biofilmes foram pré-fixados com metanol absoluto durante 20 min e em seguida fixados pelo calor a 50° C durante 60 min. Então o biofilme foi corado com cristal violeta 0,4% (p/v) durante 25 min em 25° C. O cristal violeta não ligado foi removido com água destilada e o corante ligado ao biofilme foi solubilizado com etanol absoluto por 15 min, e a absorbância foi medida a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

2.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média ou a média percentual $\pm$ desvio padrão (DP). ANOVA unilateral (significância em $p < 0,05$) foi conduzida usando

Graphpad Prism 8. As diferenças significativas entre os grupos de tratamento foram analisadas e as diferenças estatísticas foram determinadas usando o teste de intervalo de Tukey; um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

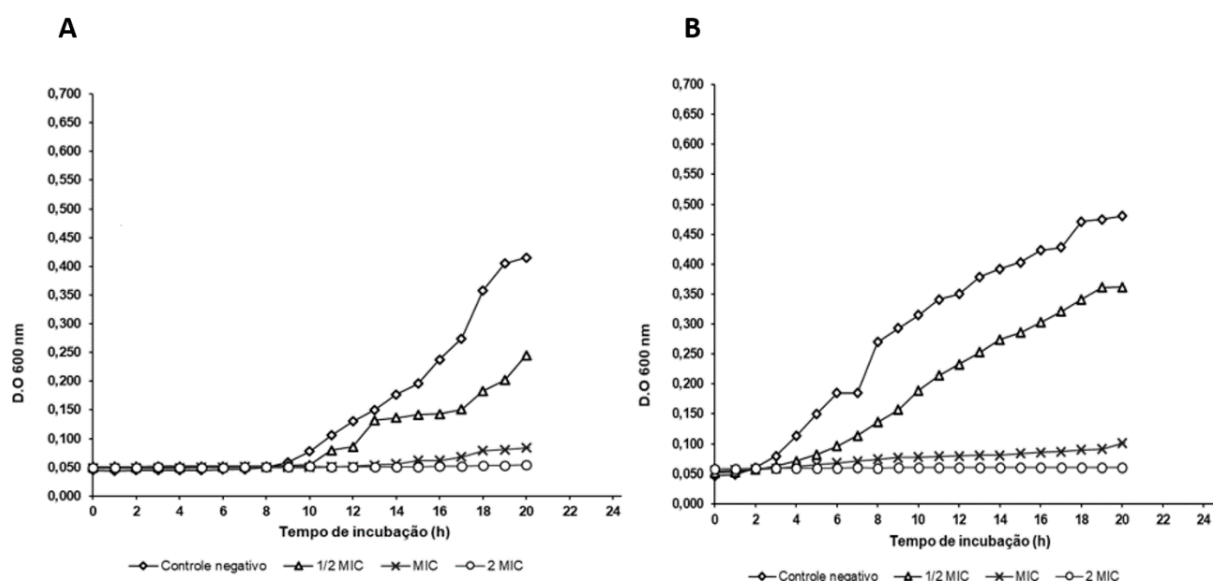
A dificuldade de controle de infecções humanas e animais causadas pela bactéria patogênica *S. aureus*, tem motivado a busca por novos agentes antimicrobianos mais eficazes e menos tóxicos para as células do hospedeiro. As plantas têm representado fontes de compostos com potencial farmacológico, os quais têm sido avaliados quanto ao potencial antimicrobiano e, além disso, quanto aos mecanismos de ação envolvidos nessa atividade (MORDMUANG et al., 2019; MOURA et al., 2017). A lectina de folhas de *S. terebinthifolia* (SteLL) é um agente antimicrobiano cuja atividade contra bactérias e fungo de interesse médico foi previamente relatada (GOMES et al., 2013). Neste contexto, o presente trabalho ampliou o estudo da atividade antibacteriana de SteLL ao determinar também o seu efeito na formação de biofilmes de isolados de *S. aureus* sensível e resistente à Oxacilina.

A lectina foi isolada com seus sítios de ligação a carboidratos preservados, sendo detectada uma atividade hemaglutinante específica de 30,13. Estes dados estão de acordo com relatos prévios de Gomes et al. (2013). SteLL foi agente bacteriostático e bactericida para os isolados UFPEDA 02 e UFPEDA 670 com CMI de 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ e CMB de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. SteLL foi agente antibacteriano mais eficiente contra UFPEDA 02 e UFPEDA 670 que a lectina isolada da inflorescência de *Alpinia purpurata* (ApuL), a qual mostrou CMI de 50 e $>400 \mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* padrão e resistente à Oxacilina, respectivamente (FERREIRA et al., 2018).

A cinética de crescimento das cepas UFPEDA 02 e UFPEDA 670 tratadas com SteLL foi avaliada e as culturas foram monitoradas durante 24 h na presença da lectina nas concentrações de $2 \times \text{CMI}$, CMI e $\frac{1}{2}\text{CMI}$. A Figura 1 mostra as curvas de crescimento dos isolados UFPEDA 02 (Figura 1A) e UFPEDA 670 (Figura 1B) de *S. aureus* incubados com SteLL em diferentes concentrações. Na concentração correspondente a $\frac{1}{2}$ CMI, o crescimento bacteriano iniciou a partir da décima hora em UFPEDA 02 e a partir da quarta hora em UFPEDA 670, permanecendo até as

últimas horas de incubação, contudo sempre menor que o crescimento detectado no controle negativo. Na concentração correspondente à CMI foi possível observar uma acentuada inibição do crescimento que se manteve durante todo o período de avaliação nas duas linhagens. Na concentração $2 \times$ CMI não foi detectado crescimento de UFPEDA 02 e UFPEDA 670.

Figura 1: Curvas de crescimento (20 h de incubação) de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes a Oxacilina (UFPEDA 670) na ausência (controle negativo) ou presença de SteLL em diferentes concentrações. Os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (SD) de três experimentos.



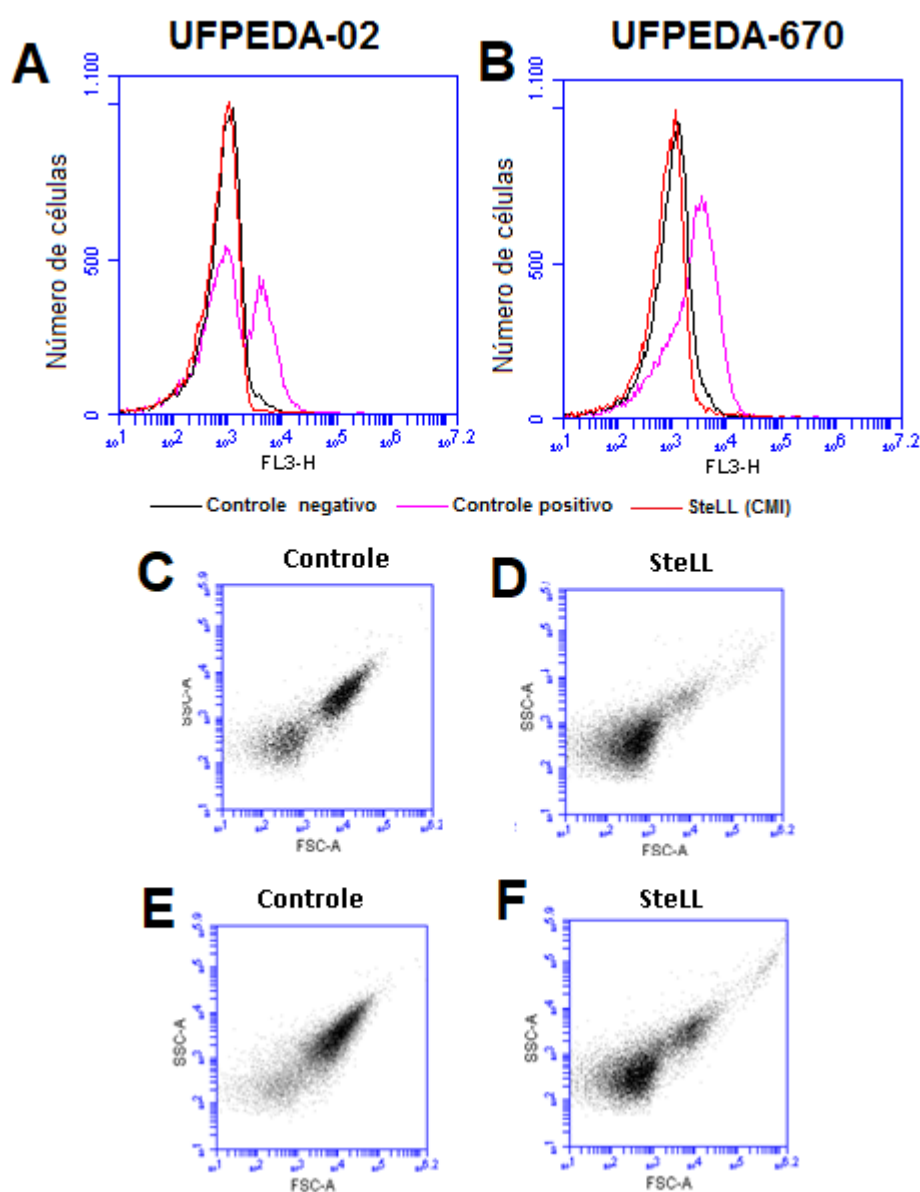
Outros estudos têm também utilizado a cinética de crescimento para avaliar a ação bacteriostática de produtos naturais sobre cepas de *S. aureus* por um período determinado de tempo. Na presença da lectina PgTeL, isolada da sarcotesta de *Punica granatum*, o crescimento de isolados clínicos de *S. aureus* 8325–4 (não resistente) e LAC USA300 (cepa MRSA) iniciou apenas a partir da nona e décima hora, respectivamente (SILVA et al., 2019a). Na presença do extrato metanólico de produtos fermentados da soja, em duas concentrações (CMI e $\frac{1}{2}$ CMI), houve uma desaceleração do crescimento bacteriano de cepas de *S. aureus* MSSA, MRSA e um isolado resistente a Oxacilina (LALOUCKOVA et al., 2021).

A citometria de fluxo foi empregada para avaliar alterações na morfologia e viabilidade em células de *S. aureus* tratadas com SteLL na CMI. Conforme esperado, a quantidade de células nos tratamentos com a lectina foi muito menor do que aquela presente no tratamento controle, o que refletiu no maior volume necessário para atingir o número estabelecido de eventos, em comparação com o controle (dados não mostrados). A maioria das células remanescentes de UFPEDA 02 (Figura 2A) e UFPEDA 670 (Figura 2B) ainda permaneceram viáveis após o tratamento com SteLL na CMI, conforme indicado pela fluorescência FL3. Esses resultados indicam a predominância de um efeito bacteriostático nessa concentração. Por outro lado, as plotagens de pontos FSC vs. SSC mostram que nos tratamentos com SteLL houve deslocamentos das células em direção a menores valores de ambos FSC e SSC (Figura 2). Esse dado indica alterações morfométricas em relação ao tamanho, forma e complexidade das células de *S. aureus*.

Estudos com *S. aureus* tratadas com as lectinas ApuL e PgTeL também utilizaram a citometria de fluxo para mensurar viabilidade celular. O tratamento com ApuL na CMI contra isolados não resistentes (UFPEDA 02) resultou em valores maiores de células não viáveis quando comparadas ao controle negativo. Esses resultados indicam que a inibição do crescimento foi associada ao comprometimento da viabilidade celular. A lectina PgTeL, por sua vez, apresentou na CMI resultados semelhantes à SteLL, pois, após o tratamento maioria das células bacterianas ainda eram viáveis, resultado que indica a predominância de um efeito bacteriostático e sugere que as alterações superficiais observadas não foram suficientes para prejudicar a permeabilidade da maioria das células (FERREIRA et al., 2018; SILVA et al., 2019).

A atividade antibacteriana das lectinas é geralmente associada à interação destas proteínas com ácidos teicóicos e teicurônicos, peptideoglicanos e lipopolissacarídeos presentes na parede celular da bactéria. Como resultado dessa interação, morte bacteriana pode ocorrer por extravasamento do conteúdo celular através de canais na parede celular formados pelas lectinas (PROCÓPIO et al, 2017; COELHO et al, 2018).

Figura 2: Análise por citometria de fluxo da viabilidade de isolados de *Staphylococcus aureus* sensível (UFPEDA 02) ou resistente à oxacilina (UFPEDA 670) tratados com SteLL na sua concentração mínima inibitória (CMI). (A e B) Sobreposição dos histogramas de marcação de células de *S. aureus* UFPEDA-02 e UFPEDA-670 com iodeto de propídeo (canal FL3) CN ou tratadas com SteLL. Plotagens de pontos FSC vs. SSC para determinação de alterações morfológicas em relação ao tamanho, forma e complexidade das células de *S. aureus* UFPEDA 02 (C e D) e UFPEDA 670 (E e F). No controle negativo (CN), foi utilizada água destilada em substituição à lectina. Álcool isopropílico foi utilizado como controle positivo.



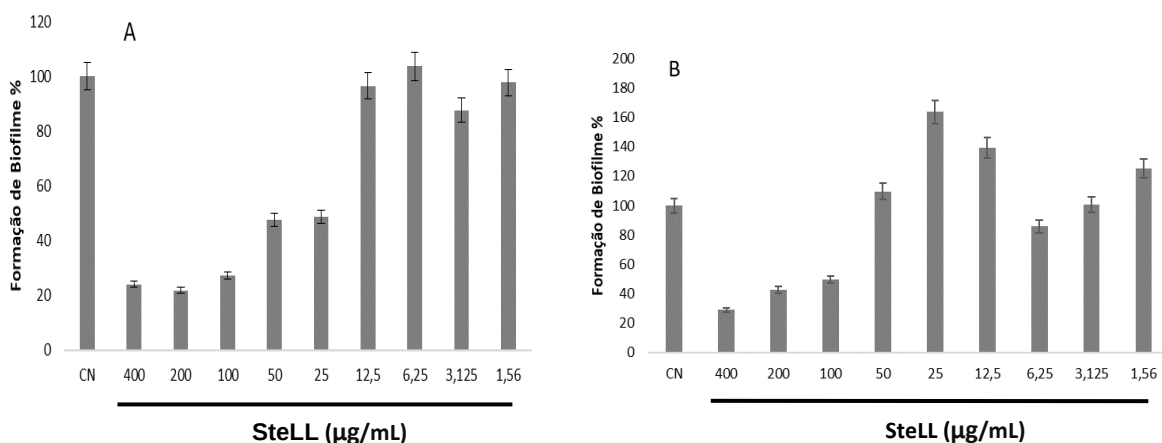
Um dos grandes problemas no tratamento de infecções causadas por bactérias é a capacidade de adaptação desses microrganismos frente a vários fatores, dentre os quais está a pressão seletiva dos agentes antimicrobianos que estimula o surgimento de resistência. Vários mecanismos podem ser utilizados

para facilitar o surgimento e a transferência dos genes ligados a resistência, destacando-se a formação de biofilmes (RAJKOWSKA; KUNICKA-STYCZYŃSKA, 2018; MEENA et al., 2019)

No ensaio para avaliação da capacidade de formação de biofilmes foram utilizadas as linhagens UFPEDA 02 e UFPEDA 670 isoladas ou associadas, em diferentes meios de cultura. Os melhores nutrientes para formação de biofilme foram encontrados no caldo Mueller Hinton (MH). Ambas as cepas, apresentaram forte capacidade formadora de biofilme.

SteLL exibiu significativa ação antibiofilme contra as linhagens de *S. aureus* sensíveis e resistente a Oxacilina. A lectina inibiu formação de biofilme por UFPEDA 02 (Figura 3A) nas concentrações entre 25 e 400 µg/mL e de UFPEDA 670 (Figura 3B) entre 100 e 400 µg/mL. Outras lectinas foram testadas e exibiram efeito antibiofilme contra isolados de *S. aureus*. A lectina CasuL, obtida da pínula foliar de *Calliandra surinamensis*, apresentou efeito inibitório de formação de biofilme para isolados de *S. aureus* sensível (6,25-800 µg/mL) e resistente à oxacilina (50-400 µg/mL) (PROCÓPIO et al., 2017b). A lectina MuHL, isolada do cerne da planta *Myracrodruon urundeuva*, foi capaz de reduzir a produção de biofilme em isolados de *S. aureus* sensível 8325-4 (50–400 µg/mL) e resistente LAC USA300 (400 µg/mL) (MOURA et al., 2021).

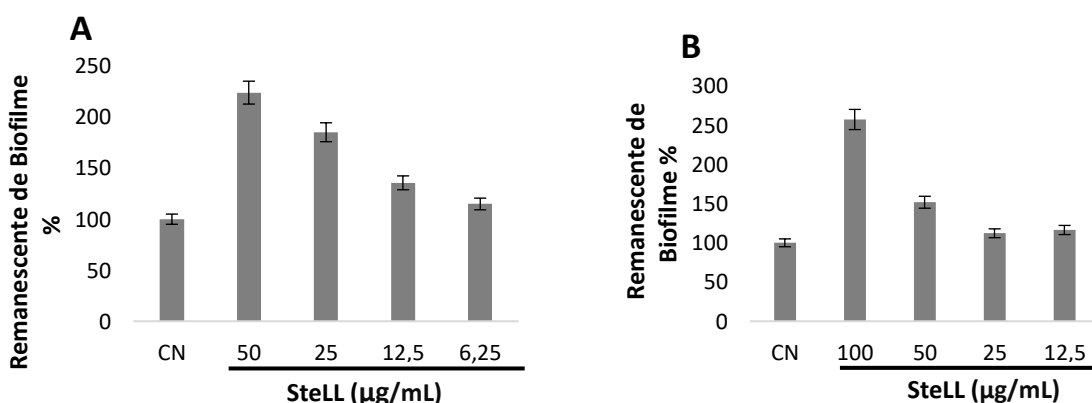
Figura 3: Atividade antibiofilme de SteLL contra os isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis (UFPEDA 02) e (B) resistentes à oxacilina (UFPEDA 670). As células foram tratadas por 24 h com a lectina e a formação do biofilme foi avaliada pelo método do cristal violeta e medição da densidade óptica em 570 nm. Células tratadas com água destilada corresponderam ao controle negativo (CN). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.



A estratégias de combate de biofilmes através da utilização de compostos provenientes de plantas envolvem dois mecanismos principais: a inibição da formação de biofilmes e a erradicação de biofilmes já formados (MOURA, 2017). A inibição da formação de biofilmes também chamada de atividade de antiformação, ocorre através do uso de compostos bacteriostáticos e/ou bactericidas, ou por meio da utilização de moléculas que impedem a adesão bacteriana a superfícies ou que atuem no bloqueio da sinalização QS. A erradicação de biofilmes já formados está relacionada à atuação de moléculas capazes de desintegrar a EPS, destruindo a estrutura tridimensional do biofilme e liberando células livres (COELHO et al., 2018).

No ensaio para erradicação de biofilme, os biofilmes de *S. aureus* não foram afetados após tratamento com a lectina nas concentrações variando de 6,25 a 50 µg/mL para UFPEDA 02 (Figura 4A) e 25 a 200 µg/mL para UFPEDA 670 (Figura 4B) em comparação com o controle. Foi observada uma maior absorbância do cristal violeta na maior concentração em ambas as linhagens, o que pode representar um mecanismo de defesa da bactéria como resposta à alta concentração da lectina. Estudos tem demonstrado que compostos de plantas podem atuar desintegrando biofilmes pré-formados. WSMoL, a lectina solúvel isolada de folhas de *Moringa oleifera*, apresentou propriedades antibiofilmes, ao inibir a formação de biofilmes de *Serratia marcescens* e erradicar biofilmes pré-formados de *Bacillus* sp. (MOURA et al., 2017).

Figura 4: Efeito de SteLL sobre biofilmes pré-formados de isolados de *Staphylococcus aureus* (A) sensíveis UFPEDA 02 ou (B) resistentes à Oxacilina (UFPEDA 670). Os valores obtidos para o biofilme não tratado (controle não tratado) corresponderam a 100% da biomassa do biofilme. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$ pelo teste T de Student.



CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que SteLL é um agente antibacteriano contra linhagens de *S. aureus* sensível e resistente à oxacilina. A lectina exerceu efeitos sobre o crescimento e causou alterações morfométricas relacionadas ao tamanho, forma e complexidade celular. Além disso, a lectina também demonstrou potencial para inibir a formação de biofilme dos isolados testados.

REFERÊNCIAS

- ABUSHAHEEN, M. A. et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, jun. 2020.
- ASENJO, A.; OTEO-IGLESIAS, J.; ALÓS, J.-I. What's new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin? **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)**, v. 39, n. 6, p. 291–299, jun. 2021.
- BING, D. H.; WEYAND, J. G. M.; STAVITSKY, A. B. Hemagglutination with Aldehyde-Fixed Erythrocytes for Assay of Antigens and Antibodies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 4, p. 1166–1170, 1 abr. 1967.
- CAMAROTI, J. R. S. L. et al. *Sitophilus zeamais* adults have survival and nutrition affected by *Schinus terebinthifolius* leaf extract and its lectin (SteLL). **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 81–89, jun. 2018.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11th Edition, CLSI guideline M07.
- COELHO, L. C. et al. Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, nov. 2018.
- COSTA, T. et al. PBP4: A New Perspective on *Staphylococcus aureus* β -Lactam Resistance. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 57, 22 jun. 2018.
- FALCÃO, M. P. M. M. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira) e suas propriedades na Medicina Popular. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 2, p. 23, 9 dez. 2015.
- FERREIRA, G. R. S. et al. Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 152–162, nov. 2018.
- FOURNIÈRE, M. et al. Effects of *Ulva* sp. Extracts on the Growth, Biofilm Production, and Virulence of Skin Bacteria Microbiota: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Cutibacterium acnes* Strains. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4763, 6 ago. 2021.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672–679, mar. 2013.

HU, X.-Y.; LOGUE, M.; ROBINSON, N. Antimicrobial resistance is a global problem – a UK perspective. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 36, p. 101136, jun. 2020.

LALOUCKOVA, K. et al. In Vitro Antibacterial Effect of the Methanolic Extract of the Korean Soybean Fermented Product Doenjang against *Staphylococcus aureus*. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2319, 5 ago. 2021.

LIMA, I. M. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of *Staphylococcus aureus*-infected macrophages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18159, dez. 2019.

MEENA, M. et al. Virulence Factors and Their Associated Genes in Microbes. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. p. 181-208, 2019.

MORDMUANG, A. et al. Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using in vitro and in vivo models of mastitis. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, p. 49, dez. 2019.

MOURA, M. C. et al. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 861–874, out. 2017.

MOURA, M. C. et al. Anti-staphylococcal effects of *Myracrodruon urundeuva* lectins on nonresistant and multidrug resistant isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 745–754, mar. 2021.

PARASTAN, R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. **Gene Reports**, v. 20, p. 100739, set. 2020.

PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. Antibacterials: synthesis, properties and biological activities. **Nova Science Publishers Inc.**, New York, p. 69-89, 2017a.

PROCÓPIO, T. F. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419–429, maio 2017b.

RAMOS, D. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 148–157, abr. 2019.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Typing and virulence factors of food-borne *Candida* spp. isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 279, p. 57–63, ago. 2018.

SANTOS, A. L. S. DOS et al. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 9, 26 jul. 2018.

SANTOS, A. J. C. A. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, p. 144, abr. 2020.

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. e00026-19, 19 ago. 2020.

SILVA, P. M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) impairs growth, structure, viability, aggregation, and biofilm formation ability of *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 600–608, fev. 2019a.

SILVA, P. M. et al. *Punica granatum* sarcotesta lectin (PgTeL) has antibacterial activity and synergistic effects with antibiotics against β -lactamase-producing *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 135, p. 931–939, ago. 2019b.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, jul. 2015.

TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 327-335, 2011.

YIN, W. et al. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, p. 3423, 12 jul. 2019.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os dados revisados no Capítulo I desta Dissertação demonstram que os compostos produzidos pelas plantas podem constituir uma fonte de novos fármacos para tratamento de mastite.
- O extrato de folhas de *S. terebinthifolia* é um agente antimicrobiano ativo contra isolados de *Staphylococcus* causadores de mastite caprina por inibir o crescimento e a formação de biofilmes.
- SteLL é um princípio antibacteriano do extrato de folhas de *S. terebinthifolia* ativo contra linhagens de *S. aureus* sensível e resistente à Oxacilina por afetar o crescimento e parâmetros morfométricos relacionados ao tamanho, forma e complexidade celular das bactérias, bem como inibir a formação de biofilmes.