



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AILA FABIANE PEIXOTO

Atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e da resina de
Amburana Cearensis sobre *Staphylococcus* coagulase positiva causadores de
mastite subclínica em vacas

Recife – PE

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AILA FABIANE PEIXOTO

Atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e da resina de *Amburana Cearensis* sobre *Staphylococcus* coagulase positiva causadores de mastite subclínica em vacas

Tese apresentada ao programa de Biociência animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientadora: Elizabeth S. de Medeiros
Co-orientador: Mateus Matiuzzi da Costa

Recife – PE
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)

- p379a Peixoto, Aila Fabiane
Atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e da resina de *Amburana Cearensis* sobre *Staphylococcus coagulase positiva* causadores de mastite subclínica em vacas / Aila Fabiane Peixoto. - 2022.
85 f. : il.
- Orientadora: Elizabeth Sampaio de .
Coorientador: Mateus MatiuZZi da Costa.
Inclui referências e apêndice(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.
1. *Staphylococcus aureus*. 2. biofilmes. 3. resistência. I. , Elizabeth Sampaio de, orient. II. Costa, Mateus MatiuZZi da, coorient. III. Título

AILA FABIANE PEIXOTO

Atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e da resina de *Amburana Cearensis* sobre *staphylococcus* coagulase positiva causadores de mastite subclínica em vacas

Tese defendida e aprovada em 02/08/2022. Banca examinadora:

Dra. Elizabeth S. de Medeiros
Presidente

Dra. Alda Verônica Souza Livera
1º Membro (MSc/DSc)

Dra. Maria Betânia de Queiroz Rolim
2º Membro (MSc/DSc)

Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
3º Membro (MSc/DSc)

Dr. Rinaldo Aparecido Mota
4º Membro (MSc/DSc)

Dedico essa conquista a Deus, a meus pais e a todos aqueles que acreditam no meu potencial e na minha capacidade de lutar para alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter guiado e iluminado os meus passos e por não me deixar desistir apesar das dificuldades.

Aos meus pais José Ailton e Maria Cícera, que mesmo distantes sempre me deram forças, me incentivaram em todos os momentos e compreenderam minha ausência em toda essa jornada.

A todos os demais membros da minha família, de sangue e de coração, que conhecem minhas lutas e mesmo estando distantes fisicamente, torcem por mim e vibram com minhas conquistas.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros, pela aceitação, pela orientação, paciência e principalmente, pelos ensinamentos a mim transmitidos.

A meu Co-orientador, Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, pelo acolhimento conselhos, dicas, orientação, paciência e todos os direcionamentos que me deu, sem sua ajuda e apoio essa conquista não teria sido possível.

A todos os professores com os quais tive a oportunidade de conviver, pelo conhecimento que comigo compartilharam.

A todos os colegas de turma e de laboratório, que apoiando uns aos outros conseguimos ao longo do curso ultrapassar os obstáculos e chegar até o fim.

A todos os amigos, amigas e familiares pela compreensão e amizade.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho o meu mais profundo agradecimento.

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e da resina de *Amburana Cearensis* sobre SCP causadores de mastite subclínica, isolados de amostras de leite bovino provenientes de rebanhos das Bacias Leiteiras dos Estados de Alagoas e Pernambuco. Foram selecionadas 14 propriedades, sendo 10 situadas em municípios da bacia leiteira do Estado de Alagoas e 4 em municípios da bacia leiteira do Estado de Pernambuco, que forneciam leite para laticínio sob inspeção federal. Foi realizado o teste CMT em 1405 vacas e coletadas as amostras CMT positivo a partir de 2+, totalizando 1289 amostras submetidas ao exame microbiológico para isolamento e identificação de SCP, totalizando 179 isolados. SCP foram submetidos ao teste de sensibilidade ao antibiótico padrão (Oxacilina), pelo método de difusão em disco e os isolados resistentes, foram submetidos ao teste de aderência em microplacas para quantificação do biofilme. Nos isolados de SCP, classificados como fortes e moderado formadores de biofilme, foi realizada a pesquisa dos genes *nuc*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *icaA* e *icaD* e avaliou-se a atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e da resina de *Amburana Cearensis* pelo método de microdiluição em caldo, sendo realizada a determinação das Concentrações Inibitória (CIM) e Bactericida (CBM) das substâncias e a ação antibiofilme. Os valores de CIM variaram de 3,125 até 781,25 µg/mL para a própolis vermelha e de 195,31 até 390,62 µg/mL para a resina de umburana. A própolis vermelha apresentou uma CBM variando de 3,125 até 1.565,50 µg/mL, enquanto a CBM para a resina de umburana variou de 195,31 até 781,25 µg/mL. As duas substâncias também apresentaram eficácia na redução do biofilme em formação e consolidado, sugerindo uma ação promissora dessas substâncias contra essa estrutura de resistência microbiana e sendo uma possível alternativa a futura utilização das mesmas como drogas com ação antimicrobiana.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, biofilmes, resistência.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of red propolis and Amburana Cearensis resin on SCP that cause subclinical mastitis, isolated from bovine milk samples from dairy herds in the states of Alagoas and Pernambuco. Fourteen properties were selected, 10 located in municipalities in the dairy basin of the State of Alagoas and 4 in municipalities in the dairy basin of the State of Pernambuco, which supplied milk for dairy under federal inspection. The CMT test was performed in 1405 cows and positive CMT samples from 2+ were collected, totaling 1289 samples submitted to microbiological examination for SCP isolation and identification, totaling 179 isolates. SCP were submitted to the standard antibiotic (Oxacillin) sensitivity test, by the disk diffusion method and the resistant isolates were submitted to the microplate adhesion test to quantify the biofilm. In the SCP isolates, classified as strong and moderate biofilm formers, the search for *nuc*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *icaA* and *icaD* genes was carried out and the antimicrobial and antibiofilm activity of red propolis and Amburana Cearensis resin was evaluated by microdilution method in broth, being carried out the determination of Inhibitory Concentrations (MIC) and Bactericidal (CBM) of the substances and the antibiofilm action. MIC values ranged from 3.125 to 781.25 µg/mL for red propolis and from 195.31 to 390.62 µg/mL for umburana resin. The red propolis presented a CBM ranging from 3,125 to 1,565.50 µg/mL, while the CBM for the umburan resin ranged from 195.31 to 781.25 µg/mL. Both substances were also effective in reducing the formation and consolidation of biofilms, suggesting a promising action of these substances against this structure of microbial resistance and being a possible alternative for their future use as drugs with antimicrobial action.

Key words: *Staphylococcus aureus*, biofilms, resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Mastite Bovina	11
2.2 Diagnóstico da Mastite.....	13
2.3 <i>Staphylococcus</i> spp.....	15
2.4 Resistencia a antimicrobianos.....	17
2.5 Biofilmes	20
2.6 Fitoterapia.....	24
2.7 Propólis e Propólis Vermelha.....	25
2.8 <i>Amburana cearensis</i>	28
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Área de estudo e coleta de material.....	32
4.2. Isolamento de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP)	33
4.3. Testes de suscetibilidade de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP) a Oxacilina por Disco-difusão em ágar	34
4.4 Caracterização da produção do biofilme de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva (SCP) resistentes a Oxacilina.....	34
4.5 Quantificação do Biofilme	34
4.6 Caracterização genotípica dos isolados.....	35
4.7 Atividade Antimicrobiana pelo método de Microdiluição em caldo	37
4.8 Atividade Anti-biofilme	38
4.8.1 Interferência do EHP e da resina de umburana com o biofilme bacteriano em formação.	38
4.8.2 Interferência do EHP e da resina de umburana com o biofilme bacteriano consolidado	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação na glândula mamária capaz de causar prejuízos à produção e industrialização do leite, por reduzir sua qualidade e quantidade (SAEKI et al., 2011). Essa enfermidade é considerada uma das principais causas para a adoção de terapias antimicrobianas em bovinos leiteiros (KALIWAL et al., 2011). O uso inadequado dessas substâncias representa uma ameaça à saúde pública, em função do risco de resíduos no leite e, principalmente, pela seleção de isolados bacterianos resistentes (VERMELHO et al., 2007; ACOSTA et al., 2016; LANGONI et al., 2017).

Embora possa ser ocasionada por inúmeros patógenos, *Staphylococcus* spp. constitui o principal gênero bacteriano associado à etiologia de mastite nos rebanhos do Brasil e do mundo (WHIST et al., 2009; LOPES et al., 2014). Sendo as bactérias SCP, em especial *S. aureus*, reconhecido como o principal patógeno da mastite bovina, com elevadas prevalências (ZAFALON et al., 2008; SANTANA et al., 2010; PINTO et al., 2011). A virulência desse micro-organismo depende da produção de exotoxinas, proteínas de superfície e polissacarídeos extracelulares (MELO, 2008). A habilidade de aderência ao epitélio da glândula mamária associada à produção de biofilme é uma capacidade reconhecida como uma vantagem fisiológica na sua possível atuação como agente etiológico (MELO, 2008; MEIRA, 2011).

O biofilme consiste em uma matriz constituída por micro-organismos, substâncias poliméricas extracelulares, partículas retidas e substâncias dissolvidas e absorvidas. (CHAGAS et al., 2015). É um tipo de organização extremamente vantajosa aos micro-organismos por fornecer proteção contra condições de estresse, como: desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003; MELO et al., 2012). Essa estrutura permite a sobrevivência da bactéria no ambiente por longos períodos e impede a ação de antibióticos e desinfetantes (TREMBLAY et al., 2013), através da baixa difusão dessas substâncias na matriz e a baixa atividade metabólica das bactérias dentro dos biofilmes (MELO et al., 2012).

A seleção de micro-organismos resistentes e produtores de biofilme nas terapias antimicrobianas convencionais tem fomentado o desenvolvimento de novas

abordagens terapêuticas. Estudos envolvendo substâncias naturais têm sido desenvolvidos no contexto de potencialização da sensibilidade, bem como para inibição da formação de biofilme (LEWIS, 2013). Esses produtos estão ganhando cada vez mais espaço por apresentarem fácil aplicação, menor custo, ação bactericida e bacteriostática (MATHEWS; BINNINGTON, 2002). Além disso, os produtos naturais mostram-se promissoras fontes de moléculas bioativas, sendo consideradas fortes candidatas a serem utilizadas na terapêutica (FERNANDES, 2017). Dentre essas substâncias é possível citar a própolis vermelha e *Amburana cearensis*.

A própolis é um composto resinoso elaborado por abelhas melíferas que contém mais de 300 elementos (KHALIL, 2006). A própolis vermelha foi identificada na região nordeste brasileira, e apresenta várias ações terapêuticas, como: antibacteriana (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011), antifúngica (SIQUEIRA et al., 2009), anti-inflamatória (BARRETO, 2008; CAMPOS et al., 2015) e antioxidante (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011). Enquanto a *A. cearensis*, uma planta arbórea amplamente distribuída no Nordeste brasileiro, cujas partes tem apreciáveis propriedades terapêuticas na medicina popular, apresentando atividade anti-inflamatória, analgésica, antiespasmódica e broncodilatadora (ALMEIDA et al., 2010).

Diante do exposto, destaca-se a importância do uso de terapias baseadas em produtos naturais, no tratamento de doenças infecciosas, através da descoberta de substâncias de interesse terapêutico presentes na biodiversidade local.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite Bovina

Mastite é um processo inflamatório do úbere do animal, com casos em todos os países do mundo, em decorrência da agressão da glândula mamária por diferentes agentes, como microrganismos, traumas físicos e substâncias químicas irritantes (SILVA; MOTA, 2019). A identificação dos micro-organismos que causam a afecção da glândula mamária torna-se necessária, seja para o controle e prevenção, como também, para o monitoramento de rebanhos (RIBEIRO et al., 2003). Sua prevalência está relacionada com o manejo sanitário dos animais e da ordenha, e trata-se de um entrave para a produção leiteira, repercutindo negativamente no que se refere à qualidade do leite, prejuízos econômicos e problemas de saúde pública (LANGONI et al., 2017).

A mastite bovina é considerada a doença que causa grandes prejuízos econômicos à produção leiteira (RIBEIRO et al., 2003). As perdas ocasionadas pela mastite, incluem os gastos com diagnóstico microbiológico, medicamentos, mão de obra, descarte de leite, redução da produção de leite em razão da mastite clínica e subclínica, descarte do animal ou perda do quarto mamário, risco de transmissão da infecção para outras vacas, além do risco de veiculação de patógenos aos alimentos (SANTOS et al., 2010; KEFEE, 2012; GOMES; HENRIQUES, 2016).

No rebanho brasileiro, a estimativa da prevalência da doença é de 20 a 38%, o que pode representar uma perda de 12 a 15% da produção (EMBRAPA, 2016). Santos e Fonseca (2007) dividem a porcentagem do prejuízo causado pela mastite em um rebanho, como sendo 8% atribuído a gastos com tratamento, 8% com descarte de leite, 14 % com morte ou descarte prematuro e 70% com a redução da produção de leite. Os três primeiros são imputados a casos de mastite clínica e o último a casos de mastite subclínica. Lopes et al. (2012), ao estudarem o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros, estimaram que o impacto econômico anual da mastite foi de R\$ 72.784,74; R\$ 160.481,82 e R\$ 277.411,25, para frequências médias anuais de 1, 7 e 15%, respectivamente.

A instauração inflamatória na mastite objetiva-se em expurgar micro-organismos infecciosos, neutralizar toxinas, contribuir na reparação do tecido afetado e reestabeler funções fisiológicas da glândula mamária. A intensidade do processo inflamatório varia dependendo da forma como o úbere reage frente à fonte de irritação, podendo ocorrer de forma subaguda, aguda, superaguda ou crônica (PHILPOT; NICKERSON, 2000; LADEIRA, 2007; MASSEI et al., 2008). Isso acontece em decorrência da interação de fatores relacionados ao animal, patógeno e ambiente. Podendo ser, de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais, evidenciando as de origem bacteriana, responsáveis por aproximadamente 90% dos casos (PHILPOT; NICKERSON, 1991; BRITO, 2000; FREITAS et al., 2005).

Na mastite, os micro-organismos invadem o canal do teto e glândula mamária, se multiplicam, causam lesão no tecido secretor de leite, produzem toxinas, e ocasionam trauma e irritação proveniente de agentes químicos. Esse quadro causa um aumento no número de leucócitos, ou células somáticas no leite, reduzindo sua quantidade e afetando negativamente a qualidade do leite e dos subprodutos (KULKARNI; KALIWAL, 2013).

A enfermidade apresenta-se de duas formas, podendo ser classificada como clínica ou subclínica. Na forma clínica, ocorrem alterações macroscópicas do leite, com flocos de pus e leite com aspecto mais aquoso, além dos sinais clínicos típicos de inflamação que podem ser observados. A mastite subclínica apresenta prevalência elevada, sendo a responsável pelas maiores perdas na indústria leiteira (ACOSTA et al., 2016). Ela caracteriza-se por apresentar alterações na composição do leite, tais como aumento no número de células somáticas e na concentração dos teores de sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (SÁ et al., 2018).

Os agentes causadores da mastite bovina são divididos como: contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasmas bovis*); patógenos ambientais (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.); patógenos secundários ou menores (*Staphylococcus coagulase negativa* - SCN); e patógenos incomuns (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., *Pasteurella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, algumas espécies de bactérias anaeróbias, fungos filamentosos e leveduras)

(MENDONÇA et al., 1999; RADOSTITIS et al., 2002; QUINN et al., 2005; ANDRADE, 2006; BUITENHUIS et al., 2011).

As mastites causadas por *S. aureus*, principal espécie de *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), são prevalentes mundialmente (STANFORD et al., 2006), e esse agente é reconhecido como um dos principal patógenos da mastite bovina (ZAFALON et al., 2008).

Tanto as mastites subclínicas como clínicas podem ser classificadas como contagiosa e ambiental. No primeiro caso, causada por patógenos que são encontrados na pele e mucosas dos animais, enquanto no segundo, por patógenos encontrados principalmente no ambiente onde os animais são mantidos, incluindo-se todas as instalações de manejo (LANGONI, 2013). Micro-organismos contagiosos são comumente encontrados no úbere ou superfície do teto de vacas infectadas e são a principal fonte de infecção entre os quartos não infectados e infectados do úbere (SÁ et al., 2018).

O principal ponto de propagação dos agentes contagiosos é o úbere de um animal infectado, o contágio ocorre entre as vacas ou entre os quartos mamários durante a ordenha por meio de equipamentos contaminados, mãos dos ordenhadores, ou panos compartilhados. Neste caso, as mastites tendem a persistir na glândula mamária mostrando-se na forma subclínica com episódios clínicos intermitentes. A origem dos agentes ambientais é o próprio local onde a vaca vive e a mastite ambiental, exibe-se mais na forma clínica que subclínica; sendo caracterizada como uma infecção curta, resultando em queda brusca da produção de leite, e até mesmo, a morte da vaca (SANTOS; TOMAZI, 2012).

2.2 Diagnóstico da Mastite

A análise microbiológica é considerada o método laboratorial padrão para o diagnóstico da mastite bovina e seu principal objetivo é possibilitar resultados seguros de forma que permitam a ação de medidas próprias de controle, direcionadas para o ambiente ou para a higiene da ordenha que possam ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado (BRITO et al., 1999). O conhecimento do agente causador da mastite é extremamente importante, para o controle da mastite, e conseqüentemente, para a tomada de decisões no rebanho,

no que se refere a recomendações de tratamento e descarte (FONSECA; SANTOS, 2001).

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito através de exame clínico criterioso da glândula mamária, que identifica os sinais clínicos da enfermidade e/ou através do uso da caneca de fundo preto ou caneca telada antes de cada ordenha, onde são desprezados os primeiros jatos e visualizam-se as alterações macroscópicas do leite (RIBEIRO et al., 2003; DIAS, 2007; SÁ et al., 2018).

Na forma subclínica não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere, mas sim uma infecção assintomática, caracterizada principalmente por mudanças na composição do leite. A ausência de sinais clínicos da mastite subclínica relaciona-se diretamente com a alta prevalência dessa doença nos rebanhos leiteiros (SILVA, 2016). No diagnóstico da mastite subclínica, é observado se houve um aumento na Contagem de Células Somáticas (CSS) no leite (DURR, 2012) e existem várias maneiras de se estimar ou de efetivamente contá-las.

O procedimento mais utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica é o California Mastitis Test (CMT), desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957). Por sua praticidade e preço muito acessível, ainda, pode ser realizado ao lado dos animais, e seus resultados são imediatos. O exame do CMT baseia-se na observação visual da mistura do leite com o reagente. A reação se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas (BRITO et al., 2002; MELO, 2008). O reagente de CMT é um detergente com indicador de pH, que ao ser misturado ao leite em partes iguais dissolve as paredes celulares e nucleares dos leucócitos presentes, liberando o material nuclear. O resultado é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura do leite e reagente, sendo realizado em bandeja apropriada (AIRES, 2010). A classificação é baseada em cinco escores que são: negativo, traço, leve (+), moderada (++) e severa (+++) (RIBEIRO et al., 2003). O ponto negativo do CMT é que ele apenas mensura o conteúdo de células de forma subjetiva (BRITO et al., 2002). Para Langoni (2000), a subjetividade do resultado do CMT representa uma desvantagem, principalmente no que se refere a dosagens erradas de reagente e de leite e da falta de padronização da leitura, que estará sujeita a variações, de acordo com o profissional que estará realizando o teste. É importante ressaltar que o CMT é um ótimo teste de triagem, mas é através da contagem de células somáticas que é

possível afirmar a condição subclínica (SADEK et al., 2017).

O Wisconsin Mastitis Test (WMT), também chamado de viscosímetro, é o resultado do aprimoramento do CMT, e seu objetivo é suprimir a subjetividade dos resultados desse teste. Realiza-se em tubo graduado, no qual adicionam-se quantidades exatas de leite e reagente, o mesmo usado para o CMT (LANGONI, 2000). O reagente atua sobre as células somáticas do leite formando um gel viscoso na presença de inflamações como a mastite. O tubo por ser graduado, expressa o resultado em milímetros, de acordo com a maior ou a menor viscosidade da reação, acrescentando-se, à leitura do teste, quatro zeros ao número constatado (OLIVEIRA, 2012).

De outro modo, pode-se enumerar efetivamente a quantidade de células somáticas, o que pode ser realizado em laboratório especializado da Rede Brasileira de Controle de Qualidade do Leite, ou por meio da contagem eletrônica de células somáticas de amostras individuais de cada vaca (FONSECA; SANTOS, 2001). A CCS é feita automaticamente em equipamentos que facilitam a análise de grande número de amostras. As células somáticas também podem ser contabilizadas pelo exame microscópico de lâminas coradas, entretanto, é mais trabalhoso, possui custo elevado e não permite automação (BRITO et al., 2002). A CCS do leite de vacas sadias é menor que 200.000 cel. /mL e quando o processo inflamatório se instala este número tende a se elevar (SANTOS; FONSECA, 2007).

2.3 *Staphylococcus* spp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos pertencentes à família Staphylococcaceae, com arranjos em formato de “cachos de uva” e diâmetro, de aproximadamente, 10 µm. Esses micro-organismos são anaeróbios facultativos (fermentativos), catalase positiva, coagulase positiva, oxidase negativa, não móvel e crescem bem em meio Agar sangue (WU et al., 2016). São bactérias mesófilas com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8 C°, porém a temperatura ótima de crescimento, na qual a taxa específica de crescimento é máxima, é entre 35 e 37° C; e pH ideal entre 7 a 7,5 (SANTANA et al., 2010).

Staphylococcus spp. é considerado como o principal gênero de bactérias

responsáveis pela casuística da mastite bovina nos rebanhos do Brasil e do mundo (GAO et al., 2012). Evidencia-se a grande importância epidemiológica e clínica, desta bactéria nas mastites bovinas relacionando-a as falhas no manejo na ordenha, e também, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa dos rebanhos, visto que, a contaminação por esses agentes ocorre principalmente durante a ordenha, isto porque o reservatório de micro-organismos desse gênero é a glândula mamária (ANDRADE et al., 2009). Mota et al. (2012) constataram 39,3% de participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco. Na mesma região, Barbalho e Mota (2001) examinaram 104 amostras de leite provenientes de 43 animais e mostraram que as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. foram isoladas em 50 amostras, o que corresponde a 38,8%. Estas bactérias podem ter contato com o leite, contaminando-o, ainda no ambiente intramamário, por serem agentes etiológicos da mastite clínica e subclínica (BANDEIRA et al., 2013). De acordo com Correa et al. (2009), essa classe microbiana é provavelmente transmitida para o leite a partir das infecções da glândula mamária.

As espécies de *Staphylococcus* spp dividem-se em dois grupos amparados na capacidade de coagular o plasma, de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase: SCP e SCN (ELZÉBY, 2013). Maior parte das espécies são SCN, e as espécies *S. aureus*, *S. schleiferi* subsps. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* são denominadas como SCP (BANNERMAN, 2003; SANTOS, 2009). As bactérias SCP, principalmente *S. aureus*, são os principais agentes etiológicos da mastite. Esses isolados podem produzir enterotoxinas capazes de causar toxinfecções alimentares, representando um risco para saúde pública (SANTANA et al., 2010; PINTO et al., 2011). A existência dessas espécies em alimentos é comum, principalmente por se tratar de um micro-organismo que está em contato frequente com o homem e os animais (DIEDRICH et al., 2013).

Pyorala e Taponen (2009), fazem alusão para a emergência de SCN como micro-organismos causadores de mastite, responsáveis pela diminuição da qualidade do leite, gerando prejuízos econômicos ao produtor e a indústria leiteira. Mota et al. (2012), ao pesquisarem a frequência dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco, observaram que 58,4% dos isolados foram classificados como SCN, 28,9% como *S. aureus* e 12,7% como SCP.

Entre os agentes etiológicos das mastites bacterianas, o *S. aureus* destaca-se como um dos mais frequentes e que causam os maiores prejuízos econômicos à pecuária leiteira brasileira (COSTA et al., 2013). Segundo Conteras e Rodriguez (2011), *S. aureus* possui prevalência variando entre 81 a 94% dos casos desta enfermidade. Esse fato pode estar relacionado aos mecanismos de resistência, presença do biofilme, menor suscetibilidade aos antibióticos, ao pequeno número de cura durante a lactação e à presença desses micro-organismos no ambiente, nos animais e no homem (OLIVEIRA; MEDEIROS, 2015).

S. aureus é a espécie mais importante relacionada com uma série de infecções e intoxicações no ser humano e nos animais, e um dos patógenos mais abundantes isolados do leite cru brasileiro (OLIVEIRA et al., 2011). As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em saúde pública, tendo em vista um considerável número de isolados que possuem a capacidade de produzir exotoxinas (HAIT et al., 2014). Nesse contexto, a capacidade de produção de toxinas por *S. aureus* no leite e produtos derivados está relacionado com surtos de intoxicação alimentar (ACOSTA et al., 2017).

Nesse sentido, vale salientar, a importância da mastite em relação à saúde pública, devido ao envolvimento de bactérias patogênicas que podem colocar em risco a saúde humana (COSER et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014).

A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser utilizado na terapia contra *Staphylococcus* spp., porém em função da seleção de isolados resistentes, houve a partir de modificações moleculares nos β -lactâmicos, o desenvolvimento da meticilina e a oxacilina. Contudo o uso indiscriminado desses antimicrobianos na terapêutica profilática humana e veterinária tem favorecido a pressão seletiva, resultando em espécies bacterianas cada vez mais resistentes e gerando os isolados conhecidos como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Além dessa característica de multirresistência a drogas, esses micro-organismos possuem a capacidade de adesão a uma variedade de substratos, formando, assim, o biofilme (ATIQUE et al., 2012; ALTIERI et al., 2013).

2.4 Resistencia a antimicrobianos

Bactérias resistentes a antimicrobianos são um perigo emergente tanto no âmbito da medicina humana quanto na veterinária (WEESE et al., 2015). A

resistência a diversos antibióticos é de considerável importância médica e pode estar relacionada com a utilização irracional e às vezes sem controle no tratamento de doenças infecciosas (MORALES et al., 2010). Por esta razão, a utilização dos diferentes antimicrobianos deve ser considerada como uma questão ética na área da saúde, principalmente relacionada a dosagens e administração adequada de cada fármaco (KIRINUS et al., 2011). Bactérias com resistência a três ou mais categorias de drogas antimicrobianas são chamadas multirresistentes (MDR) (MAGIORAKOS et al., 2012).

A resistência bacteriana acontece por meio de aquisição de elementos genéticos móveis, que permitem a bactéria uma diversidade de benefícios, como: tolerância a mudanças ambientais, estabelecimento em novos nichos ecológicos e o aumento da resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos (SHOUSA et al., 2015). Os mecanismos de resistência a antimicrobianos podem ser intrínsecos ou adquiridos por transmissão de material genético ou mutação (GUARDABASSI; DALSGAARD, 2002). A resistência natural é uma característica intrínseca do micro-organismo e é observada em todos os membros de uma mesma espécie ou gênero, independentemente do seu local de isolamento (FERREIRA et al., 2010). Já a resistência adquirida envolve alterações genéticas causadas por mutações espontâneas ou aquisição de genes exógenos por mecanismos de transdução, conjugação ou transformação associados a estruturas como os plasmídeos, integrons e transposons (BARROSO et al., 2014).

O bombeamento ativo do meio intracelular para o extracelular, ou seja, o efluxo ativo de antimicrobianos, também confere resistência bacteriana a determinados antibióticos. As proteínas de efluxo redirecionam os antibióticos através das membranas celulares, diminuindo assim a concentração no meio intracelular (FERREIRA et al., 2010; BARROSO et al., 2014).

Outro mecanismo é a produção de enzimas que têm a capacidade de inativar os antibióticos, principalmente contra β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. Um exemplo é o caso das β -lactamases que hidrolisam a ligação amida do anel betalactâmico, destruindo o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos se ligam às proteínas de ligação da penicilina (PBPs) bacterianas (FERREIRA et al., 2010; BARROSO et al., 2014).

As infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* tem se tornado um grande desafio, principalmente, no que diz respeito ao aparecimento de

cepas resistentes à terapia antimicrobiana usual. Em relação a esta terapia merece destaque o aparecimento de resistência à Penicilina, à Oxacilina, à Clindamicina e à Vancomicina, por serem os principais antibióticos utilizados na prática clínica contra infecções causadas por *Staphylococcus* spp (MIMICA 2012).

S. aureus é um patógeno proeminente que pode causar uma ampla gama de doenças, desde infecções de pele relativamente pequenas até infecções graves e potencialmente fatais, como endocardite, pneumonia e sepse. Seu impacto é aumentado pelo desenvolvimento de resistência a antibióticos, mais notavelmente *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) que é resistente a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos. Embora a meticilina não seja mais produzida, o nome MRSA persistiu e pode ser considerado como uma referência à resistência a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos. O teste de suscetibilidade agora normalmente usa oxacilina e / ou cefoxitina (PATERSON et al., 2014).

Esta classe é resistente a meticilina (resistência à cefoxitina) de considerada resistência à β -antibióticos lactâmicos, ou seja, as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. A exceção é a cefalosporina de 5ª geração - ceftobiprole, que é primeiro β -lactâmico (HUBER et. al., 2011). A espécie *Staphylococcus aureus*, resistente à oxacilina, e os *Staphylococcus* coagulase positivos que adquirem o gene cromossômico *mecA* acabam por produzir uma proteína de ligação da penicilina (PBP), a PBP2a, com baixa afinidade para todos os antibióticos β -lactâmicos (FERREIRA et al., 2010). Segundo Bignardi et al. (1996), a resistência ao grupo dos beta-lactâmicos é oriunda principalmente de dois genes *mecA* e *blaZ*. Sendo a detecção molecular de *mecA* por PCR, ou de PBP2a / PBP2', por detecção de anticorpos com ensaios de aglutinação em lâmina disponíveis comercialmente, considerada o padrão ouro para a confirmação de MRSA. Já o gene *mecC* representa uma forma recentemente conhecida de *Staphylococcus aureus* resistente à *meticilina* (MRSA), que codifica um gene *mec* divergente, e pode colonizar e causar doenças em humanos e em outras espécies hospedeiras (PATERSON et al., 2014).

Um estudo epidemiológico de mastite bovina levou ao isolamento, em 2007, de um isolado *S. aureus*, de uma amostra de leite em tanque no sudoeste da Inglaterra que era fenotipicamente MRSA (GARCIA, 2011). Naquela época, isso por si só foi imediatamente significativo porque representou a primeira detecção de MRSA no rebanho leiteiro do Reino Unido. No entanto, os testes de confirmação

para o gene *mecA* e PBP2a / 2 ' foram repetidamente negativos. O sequenciamento do genoma no Wellcome Trust Sanger Institute revelou que a cepa carregava um novo homólogo *mecA*, que era apenas 69% idêntico ao convencional *mecA* ao nível do DNA, e o PBP2a / 2 ' codificado era 63% idêntico ao nível do aminoácido. Uma pesquisa retrospectiva de coleções de isolados no Reino Unido e Dinamarca identificou mais 65 isolados positivos para esse novo homólogo, isolados não apenas de gado leiteiro, mas também de humanos, incluindo o mais antigo isolado conhecido, um isolado de sangue dinamarquês de 1975(GARCIA, 2011). A sequência SCC *mec* desse homólogo foi submetida ao Grupo de Trabalho sobre a Classificação de SCC e recebeu a designação tipo XI SCC *mec* em novembro de 2009, sendo renomeado como *mecC* em 2012 (ITO,2012). O gene *mecC* foi escolhido porque um homólogo divergente adicional de *mecA*, distinto de *mecC*, já havia sido descrito em *Macrococcus caseolyticus* (TSUBAKISHITA, 2010) e foi designado *mecB* (ITO,2012).

2.5 Biofilmes

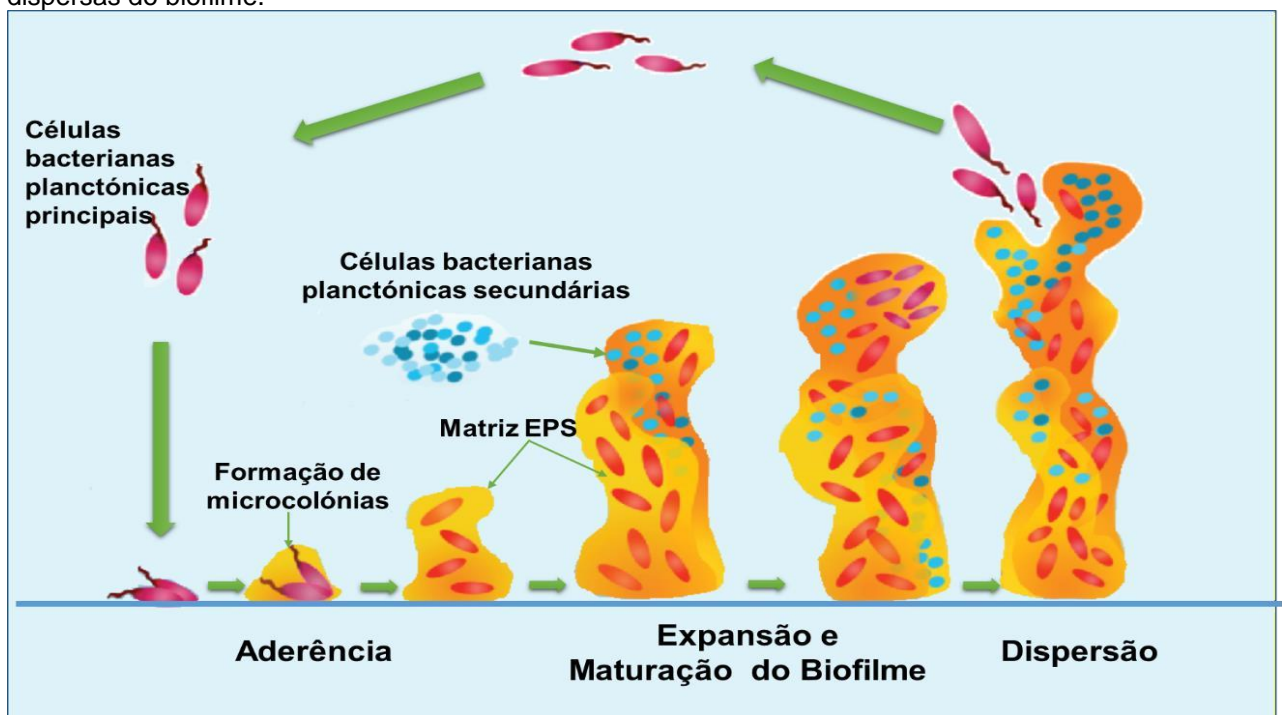
Grande parte das bactérias vivem em comunidades, agregadas a uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas, geralmente compondo biofilmes (CAIXETA, 2012). Biofilmes são um grupo de bactérias, formado por células sésseis, mono ou multiespécies, que estão aderidas a um substrato, embebidas em uma matriz de polímeros orgânicos extracelulares (COSTERTON et al., 1999; BOARI et al., 2009; SALIMENA, 2014), autoproduzida, constituída por proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos (STENVANG et al., 2016), partículas retidas e substâncias dissolvidas e absorvidas. A funcionalidade do biofilme, assim como suas características morfológicas e estruturais são dependentes da matriz polimérica, que também determina as características físico-químicas e biológicas (CHAGAS et al., 2015). Essa matriz permite o “sequestro” e a “concentração” de nutrientes, como carbono, nitrogênio, fosfato, além da proteção das colônias que compõe o biofilme (ARCHER et al., 2011).

O biofilme confere proteção e resistência à ação de agentes antimicrobianos, bem como contra defesas do hospedeiro (KONG et al., 2006; LÓPEZ et al., 2010; ARCHER et al., 2011; PAHARIK; HORSWILL, 2016; RIBEIRO et al., 2016). Portanto, a formação dessa estrutura é considerada uma adaptação de micro-

organismos a ambientes hostis (HALL-STOODLEY et al., 2004; DE FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013).

A teoria para a formação de biofilme (Figura 1), propõe que o processo ocorre em três etapas: aderência ou fixação, acumulação/maturação, e separação/dispersão. Durante a fase de ligação, as células planctônicas aderem reversivelmente às superfícies bióticas ou abióticas e proliferam em agregados adesivos chamados de micro colônias, ocorrendo a transição do ataque reversível para o irreversível. A medida que essas micro colônias se desenvolvem, as células bacterianas produzem uma matriz extracelular que serve como um suporte essencial para estabelecer a arquitetura tridimensional desenvolvendo-se a arquitetura do biofilme. Ao atingir uma densidade celular específica, é desencadeado um mecanismo de degradação da matriz, e ocorre a dispersão de células do biofilme e o retorno ao estado de células planctônicas (STOODLEY et al., 2002; MONROE, 2007; MOORMEIER e BAYLER, 2017). A dispersão é importante para o ciclo de vida do biofilme. Isso pode acontecer em todo o biofilme ou em uma parcela dele. Esta dispersão possibilita o começo de novo biofilme em outros ambientes, promovendo a renovação da comunidade (RABIN et al., 2015).

Figura 1. Representação esquemática das etapas de desenvolvimento de biofilmes. 1- Adesão inicial e reversível das células bacterianas na superfície; 2- produção de EPS, tornando a adesão irreversível; 3 e 4- desenvolvimento e maturação da arquitetura do biofilme; e 5- as células são dispersas do biofilme.



Fonte: <http://knoow.net/ciencterravida/biologia/biofilme/>

A adesão e a formação do biofilme são dependentes de características do microrganismo, como expressão de fatores de virulência e produção da cápsula exopolimérica. A superfície aderente e outros fatores como pH, temperatura, tempo de agitação, dentre outros, também influenciam na formação dessas estruturas (CAIXETA et al., 2012). A dinâmica das formações dos biofilmes e da saída dos micro-organismos para a formação de novos biofilmes pode explicar a natureza de infecções causadas por eles; e a necessidade de extensão da terapia a fim que quebre o ciclo de formação dos biofilmes (MELCHIOR et al., 2005).

Ao formarem uma comunidade de micro-organismos, as bactérias que vivem nos biofilmes passam a viver em grande proximidade com outras bactérias da mesma estirpe ou de espécies diferentes. Muitas desenvolveram mecanismos rudimentares de comunicação bacteriana, cujo fenômeno é conhecido por *quorum sensing* (QS) (NADELL et al., 2008). Esse mecanismo é um dos principais responsáveis pela manutenção das atividades de um biofilme (YU et al., 2012).

O QS foi descrito em bactérias gram-negativas, e logo depois descobriu-se que biofilmes compostos por bactérias gram-positivas, como *S. aureus*, também possuem essa capacidade (ANTUNES et al., 2010). Uma das vantagens descritas do mecanismo de QS é a rápida adaptação a alterações ambientais (OTTO, 2004). Outra vantagem evolutiva é possibilitar às populações de bactérias presentes no biofilme distinguirem *self de non-self*, isto é, perceberem a densidade populacional de bactérias da mesma espécie/estirpe dentro de um biofilme que muitas vezes é composto por mais de um tipo de micro-organismo (NOVICK; GEISINGER, 2008). Essa capacidade de detecção da densidade ou quantidade de bactérias da mesma estirpe, através da concentração de produtos metabólicos segregados, permite aos micro-organismos gerirem o seu metabolismo, de forma mais eficiente, para utilizar os recursos disponíveis e também responder a desafios, como, por exemplo, a agentes antimicrobianos (JAYARAMA; WOOD, 2008).

A produção de biofilme é regulada por um conjunto de genes que ficam localizados no locus *ica*, os quais são responsáveis pela adesão intercelular. No operon *icaABCD*, os genes *icaA* e *icaD* têm maior relevância em *S. aureus* (DHANAWADE et al., 2010). O gene *icaA* é responsável por codificar a N-acetilglucosaminiltransferase, enzima que participa da produção de oligômeros de N-acetilglucosamina a partir da UDP-N-acetilglucosamina. Enquanto, *icaD* desempenha um papel crítico na expressão máxima de N-

acetilglucosaminiltransferase, levando à produção do polissacarídeo capsular. Também existe uma outra proteína que é conhecida como Bap, a qual está envolvida na formação do biofilme por *S. aureus*. Essa proteína, codificada pelo gene *bap*, está implicada na formação de biofilme através da fixação primária e adesão a superfícies. Isolados que apresentem o gene *bap* são capazes de produzir forte biofilme mesmo na ausência do operon *icaABCD* (SALIMENA et al., 2016).

Para se alcançar a inibição da formação de biofilmes, duas grandes classificações podem ser feitas: através da inibição do crescimento bacteriano, pelo uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos ou, através do bloqueio da adesão bacteriana e, conseqüentemente, da formação de biofilme por uma via que não envolve a morte bacteriana - característica marcante de um novo conceito de terapia: as terapias antivirulência. As terapias antivirulência exploram novos mecanismos de ação de compostos, visando dificultar o rápido desenvolvimento de resistência bacteriana (TRETIN et al., 2013).

A habilidade de certas espécies de *Staphylococcus* spp. se aderirem à superfície do epitélio da glândula mamária está associada à produção de biofilmes (MELO et al., 2012). A capacidade de produção de biofilme está presente na maioria das espécies de *Staphylococcus* spp. Esse mecanismo permite a sobrevivência da bactéria no ambiente por longos períodos, além de impedir a ação de antibióticos e desinfetantes (TREMBLAY et al., 2013).

O biofilme dificulta a terapêutica com antibióticos, devido à dificuldade destes agentes em atuarem sobre as bactérias que o colonizam. Esta resistência ao tratamento com drogas antimicrobianas pode estar relacionada ao fenótipo de bactérias que se encontram inativas, devido ao ambiente com pouco oxigênio e nutrientes no interior do biofilme, resultando em uma baixa atividade metabólica e taxa de divisão celular destas bactérias, além da barreira que o biofilme gera, dificultando a atuação dos antibióticos no interior dessa estrutura (ARCHER et al., 2011). Além do mais, existem hipóteses de que outros micro-organismos interagem com os estafilococos, gerando uma comunidade heterogênea de bactérias, agravando o quadro infeccioso e, conseqüentemente, o tratamento (OTTO 2008; RIBEIRO et al., 2016), pois apesar das células que compõe o biofilme possuírem uma origem clonal, elas podem constituir subpopulações fenotipicamente distintas, a exemplo de outras bactérias e alguns tipos de fungos. Dentro do biofilme algumas células se diferenciam devido à expressão de genes distintos. Esta diferenciação é

dependente das condições extracelulares, nutrientes, oxigênio, que criam um microambiente para o desenvolvimento das células (KONG et al., 2006; LÓPEZ et al., 2010; ARCHER et al., 2011; RIBEIRO et al., 2016).

A formação do biofilme ainda é considerada uma das principais formas de patogênese. Isso é importante, principalmente, quando nos referimos à utilização de antimicrobianos para o controle e erradicação das infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus* (PARK et al., 2012; PAHARIK; HORSWILL, 2016), sendo suspeita de ser o meio através do qual os *Staphylococcus* causadores de mastites fogem do sistema imune e causam infecções intramamárias persistentes (SIMOJOKI et al., 2012).

Em *S. aureus*, o biofilme apresenta uma zona aeróbica na superfície. Quando ocorre a ativação metabólica do biofilme, nestas zonas a presença de DNA, proteínas tornam-se mais evidentes. Todavia acredita-se que dois terços do biofilme de *S. aureus* é inativo metabolicamente (OTTO, 2008; LÓPEZ et al., 2010; RIBEIRO et al., 2016). O estado fisiológico das células que compõe o biofilme pode ser monitorado pela análise da expressão de genes específicos a fim de definir as subpopulações que compõe o biofilme (LÓPEZ et al., 2010; ARCHER et al., 2011).

O tratamento antibiótico agressivo se mostra útil para controle das exacerbações de infecções crônicas por biofilme induzidas por bactérias dispersas, podendo reduzir os biofilmes, porém não eliminando as infecções causadas pelas mesmas (HOIBY et al., 2010; HOIBY, 2011) porque a concentração mínima de antibiótico para erradicação de biofilme é difícil de alcançar *in vivo* (HENGZHUANG et al., 2011).

2.6 Fitoterapia

O uso de plantas para o tratamento de doenças é histórico; quase todas as culturas e civilizações teriam feito uso da fitoterapia para tratar infecções (DE BOER et al., 2005). O problema irreversível e preocupante de resistência antimicrobiana levou ao ressurgimento do interesse em fitoterápicos como uma forma para tentar combater esse problema crescente (ADWAN et al., 2006). As principais vantagens da utilização de produtos naturais é que eles são considerados mais seguros que a alternativa sintética, oferecendo benefício terapêutico e tratamento mais acessível

(AMOS et al., 2005). Contudo é importante ressaltar a necessidade de validação, padronização científica e sistematização, bem como avaliação de segurança antes da introdução dessas substâncias no tratamento (GUPTA, JAIN, 2010)

Atualmente a utilização de compostos de origem natural tem sido alternativa para o controle da patogenicidade causada por cepas produtoras de biofilme em diferentes situações clínicas e estes compostos podem ter ação tanto antibiótica como imunomodulatória, além da ação sobre a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme (COS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016).

Os produtos naturais, tanto os compostos puros como extratos de plantas padronizados, são novas alternativas para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas. O uso dos conhecimentos etnofarmacológicos dessas substâncias também é uma alternativa para reduzir o empirismo e aumentar a probabilidade de sucesso no desenvolvimento de novas drogas de origem natural (CRAGG e NEWMAN, 2013; COS et al., 2006; TAYLOR, 2013). As fontes naturais oferecem possibilidade para descoberta de substâncias de interesse terapêutico, contudo os biomas brasileiros são pouco explorados (COSTA-LOTUFO et al., 2010; BARREIRO e BOLZANI, 2009).

2.7 Propólis e Propólis Vermelha

De acordo com Anexo VI da Instrução Normativa no 03, de 19/07/2001 do MAPA, própolis é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (BRASIL, 2001). Apresenta cores e texturas diversas, coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de inúmeras partes das plantas. Estes compostos são responsáveis pelos efeitos biológicos benéficos da própolis (GARDANA et al., 2007; CARVALHO et al., 2011).

A produção da própolis ocorre devido à necessidade das abelhas de selar e proteger seus ninhos contra intrusos (SAWAYA et al., 2009; GREGORIS; STEVANATO, 2010; FALCÃO et al., 2013). Na colmeia, esse produto possui inúmeras funções, como a reparação de danos ou rachaduras, dessa forma protegendo contra a entrada de micro-organismos; relaciona-se com as propriedades mecânicas, assim utilizada tanto na construção, quanto na adaptação

da colmeia e ainda garante um ambiente asséptico (FUNARI; FERRO, 2006). É também usada pelas abelhas para o benefício da colmeia, como proteção contra chuva, vento e umidade (BUENO-SILVA et al., 2013). Outro uso é a mumificação de insetos mortos, evitando a contaminação da colmeia por sua decomposição (BONAMIGO et al., 2017).

A utilização dessa substância por humanos é algo bastante antigo. Durante séculos, esse composto resinoso vem sendo empregado como remédio popular em várias regiões do planeta, principalmente por sua atividade antimicrobiana, já evidenciada nas colmeias (OMAR et al., 2016). O uso da própolis já era descrito nos povos da antiguidade, os egípcios também utilizavam a própolis para embalsamar os mortos (OSÉS et al., 2016; DANTAS-SILVA et al., 2017). Os gregos denominavam a própolis como “cola de abelha”, e reconheciam suas propriedades medicinais, utilizando-a como antisséptico e cicatrizante (DANTA-SILVA et al., 2017). Durante a guerra, os soldados romanos utilizavam com frequência a própolis como medicamento de emergência em suas feridas. Com isso seu uso foi se disseminado cada vez mais, e durante os séculos XVII e XX tornou-se o remédio mais popular na Europa (BRIDI et al., 2015).

A própolis é considerada um dos produtos mais heterogêneos produzidos por fontes naturais e pesquisas mostram que mais de 300 componentes estão presentes em diferentes tipos de própolis. Dentre esses compostos já identificados, observa-se a presença de ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, aldeídos aromáticos, álcoois, diterpenos, sesquiterpenos, vitaminas, minerais, lignanas, aminoácidos e ácidos graxos (RIGHI; NEGRÍ; SALATINO, 2013). Regularmente é composta de 50% de resina (contendo flavonoides e ácidos fenólicos), 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos, incluindo aminoácidos, vitaminas e minerais (BUENO-SILVA et al., 2013).

Os tipos de própolis são caracterizados em função do ambiente onde estão inseridas, sendo influenciadas pelo clima, região geográfica, temperatura, vegetação, entre outros fatores (FRANCHIN et al., 2018). Dessa forma, diferentes tipos de própolis são encontrados, sendo que sua atividade biológica estará relacionada aos seus constituintes, já que as abelhas recolhem compostos resinosos de diferentes fontes vegetais (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; SEIDEL et al., 2008). São identificadas tonalidades de própolis que variam de amarelo-esverdeado, marrom-avermelhado ao negro (INOUE et al., 2007).

No Brasil eram catalogados doze tipos de própolis, já a própolis vermelha foi catalogada como o décimo terceiro grupo existente no país, presente na região nordeste, principalmente nos estados de Alagoas, Paraíba, Bahia e Pernambuco, possuindo origem botânica na planta *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taud. (Leguminosae), conhecida como “rabo de bugio”, ou marmelo do mangue, encontrada associada a estuários, mangues e dunas; responsável por sua coloração avermelhada (DAUGSCH et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011; FRANCHI et al., 2012; FRANCHIN et al., 2018), e apresenta várias ações terapêuticas, como: antibacteriana (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011), antifúngica (SIQUEIRA et al., 2009), anti-inflamatória (BARRETO, 2008; CAMPOS et al., 2015) e antioxidante (CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011).

Uma das hipóteses quanto à atividade antimicrobiana está associada à alta concentração de flavonoides na própolis (GRANGE; DAVEY, 1990). Flavonoides representam mais de 60% da composição da própolis vermelha brasileira, como: flavonas, flavanonas, isoflavonas e flavonóis (REGUEIRA NETO et al., 2017). Os compostos fenólicos geralmente mostram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e seu efeito depende da concentração. Em baixa concentração podem interferir com enzimas de produção de energia e em maior concentração podem desnaturar proteínas (TIWARI et al., 2009).

Alencar et al. (2007) conseguiram identificar quatro isoflavonas presentes na composição da própolis vermelha, até então não encontradas nos outros 12 grupos de própolis, entre as quais: dihidroisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimethoxi-2'-isoflavona. As pesquisas realizadas por Cabral et al. (2009) não conseguiram quantificar a grande maioria das substâncias usadas como padrão nas demais própolis, como ácido cinâmico, encontrada na própolis verde. Portanto, conclui-se uma composição única da própolis vermelha.

A própolis é utilizada em várias áreas da medicina, por possuir diversas ações terapêuticas, como atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, anti-HIV, anti-carcinogênica e anti-inflamatórias (SILVA et al., 2006; PARK et al., 2002). A atividade anti-inflamatória também é característica da própolis vermelha de Alagoas e estudos apontam que essa característica está relacionada aos flavonoides que podem inibir a ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase, inibindo o processo inflamatório (NETTO et al., 2013). Bueno-Silva et al., (2013) confirmaram essa ação da própolis vermelha de Alagoas em sua pesquisa, ao identificarem atividade

inibitória contra a migração de neutrófilos a uma dose de 10 mg/kg.

Sforcin et al.(2000), verificaram em estudo utilizando a própolis verde, que *Staphylococcus aureus* são suscetíveis a baixas concentrações de extratos etanólicos e bactérias gram negativas foram inibidas em altas concentrações. Estudo utilizando a própolis sérvia comprovou que a mesma é eficaz contra bactérias gram positivas e gram negativas, sendo as mais sensíveis entre as Gram positivas: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus Aureus*, tendo as cepas apresentado valores de CIM de 0.1 µg/mL, 0.3 µg/mL, 0.3 µg/mL e 0.5 µg/mL, respectivamente (RISTIVOJEVIC et al., 2016).

Segundo Lustosa et al.(2008), a ação antimicrobiana da própolis deve-se provavelmente a dois mecanismos de ação: um deles relacionado à inibição da RNA-polimerase bacteriana e o outro causando danos funcionais e estruturais, por agirem na membrana e na parede celular do microrganismo, confirmando esse processo por meio da própolis de Anatólia na Turquia, que apresentou ação mais eficiente frente a cepas de bactérias gram-positivas do que em cepas gram-negativas.

2.8 Amburana cearensis

Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith é uma árvore de caule ereto com até 20 metros de altura e pertencente à família Fabaceae (LORENZI; MATOS, 2008). É encontrada em diversas regiões na América do Sul com característica de mata estacional, semi-decidual com poucos afloramentos rochosos. Na Argentina e Paraguai é popularmente conhecida como Palo trebol e Roble (LORENZI; MATTOS, 2002), sendo encontrada também na Bolívia, Paraguai e Peru (LEITE, 2005). No Brasil ocorre nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (FLORA DO BRASIL, 2020). A época de sua floração ocorre entre os meses de maio a julho e frutificação de junho a setembro (DRUMMOND et al., 2016).

Conhecida popularmente como “cumaru”, “amburana”, “imburana” e “umburana-de cheiro”, é amplamente utilizada na medicina popular, sobretudo na região Nordeste, no tratamento de asma, bronquites, gripes, resfriados, dores reumáticas, congestão nasal, sinusite, rinite, tosse, trombose, infecções urinárias, hipertensão, anorexia, e como cicatrizante, expectorante, emenagoga (MATOS, 1999; AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008), e

também na produção industrial do fitoterápico "xarope de cumaru" (CANUTO et al., 2008). As sementes são utilizadas como aromatizantes e repelentes de insetos (MAIA, 2004) e o mel produzido nas cavidades do caule de *A. cearensis* é extraído para consumo e comercialização (MARQUES; BARBOSA; AGRA, 2010).

A espécie é também conhecida como cerejeira e, devido à qualidade de sua madeira, tem sido explorada na movelaria fina, esculturas e marcenaria em geral, estando listada como espécie ameaçada de extinção (IBAMA, 2012). Toda a coleta da planta para as diversas finalidades de uso ainda é realizada por meio do extrativismo, que pode ser classificado como predatório. A comercialização das sementes e cascas do caule pode ser observada com frequência, em feiras livres de diversos municípios localizados no semiárido nordestino, o que contribui para a redução de populações de ocorrência natural, uma vez que impede a propagação natural da espécie (CAMPOS et al., 2013).

Quanto ao potencial antibiótico de *A. cearensis*, destacam-se os resultados obtidos com óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, entre outros que, em baixas concentrações, exerceram inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas (RECIO; RÍOS, 1989). Tais resultados apontam para a importância da planta como fitoterápico, sendo que já existem alguns produtos comerciais cujo princípio ativo principal é a cumarina. Além da cumarina, outros compostos pouco explorados em relação às suas atividades biológicas, tais como glicerídeos dos ácidos palmítico, linoleico, oleico e esteárico, obtidos da semente da planta, têm sido pesquisados (LORENZI; MATOS, 2008). Canuto (2010) cita que mais quatro compostos foram identificados em *A. cearensis*: o ácido p-hidroxibenzóico, aiapina, além dos estereoisômeros (E) e (Z) do ácido o-cumárico glicosilado, demonstrando cada vez mais seu potencial como recurso natural rico em substâncias bioativas.

Existem diversos relatos do uso tradicional de *A. cearensis* na medicina popular em várias localidades do Brasil (SILVA et al., 2012; PAULINO et al., 2011; ANDRADE et al., 2012; JUNIOR et al. 2012; BIESKI et al., 2012; SOUZA, 2011; CONCEIÇÃO et al., 2011; FREITAS et al., 2011; ROQUE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; MARQUES, 2008; GOMES et al., 2007; SOUZA e FELFILI, 2006; MORAIS et al. 2005) e a confirmação de várias das atividades biológicas atribuídas à *A. cearensis* tem sido realizadas por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Efeito analgésico (NOWACK et al., 2011), antiinflamatório (NOWACK et al., 2011; LOPES, 2010), antinocicepção e antiinflamatório (QUINTAS-JUNIOR, 2009). efeitos farmacológicos no Sistema Nervoso

Central (SNC) (LUCETTI, 2010; OMENA, 2007). e antinociceptivo e antiedematogênica, (CANUTO,2007;LEAL et al., 1997).

CARVALHO (2009) analisou a eficácia do xarope de *A. cearensis* em 42 pacientes com asma, 21 participantes ingeriram placebo e o outro grupo utilizava o xarope composto por 0,15 mg/mL de cumarina. O resultado encontrado demonstrou uma melhora na qualidade de vida dos asmáticos e não apresentou toxicidade. Gonçalves, (2007), utilizando extratos hidroalcoólicos das cascas do caule de várias espécies de plantas, dentre elas *A. cearensis*, contra micro-organismos isolados de hospitais, tais como: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp coagulase negativa, e quatro bactérias catalogadas na American Type Culture Collection (ATCC) (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium*) demonstrou que apenas *Staphylococcus epidermidis* foi sensível, com halo de 13 mm nos testes de difusão em ágar.

Estudo avaliando a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de seis plantas nativas do bioma caatinga nos estados de Pernambuco e Bahia, frente a 160 isolados de *Staphylococcus* ssp. de casos de mastite sub-clínica em ovinos e caprinos leiteiros, demonstraram que *A. cearensis* inibiu 88,1% dos isolados (PEIXOTO e COSTA, 2009). Vargas et al.,(2011) avaliaram o potencial antimicrobiano de *A. cearensis* com extrato etanólico das cascas do caule contra micro-organismos Gram positivos e negativos, tais como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi*, *Listeria* spp., *Corynebacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Proteus* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus suis*, *Nocardia* spp., *Vibrio* spp., *Micrococcus* spp. *Staphylococcus caprie*, *Edwardsiella* spp., todos de interesse veterinário, e a substância somente não exerceu ação inibitória contra *Proteus* spp., *Nocardia* spp., *S. caprae* e *S. agalactiae* (VARGAS et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme da própolis vermelha e da resina de *Amburana cearensis* sobre *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP) causadores de mastite subclínica em vacas.

3.2 Específicos

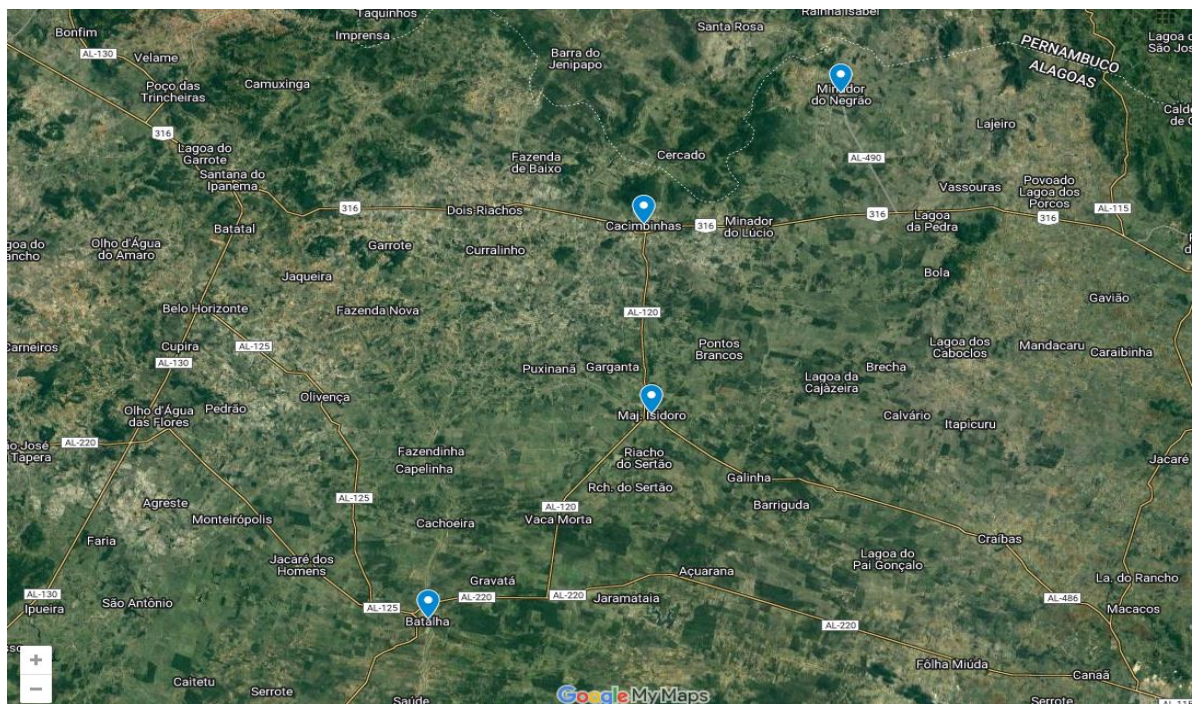
- Isolar e caracterizar SCP de amostras de leite de vacas com mastite subclínica;
- Determinar o perfil genotípico de resistência e de produção de biofilme dos isolados SCP;
- Determinar o perfil de sensibilidade de isolados SCP à oxacilina;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da própolis vermelha e da resina de *A. cearensis* sobre isolados SCP;
- Determinar a capacidade de produção de biofilme pelos isolados SCP e a atividade inibitória da própolis vermelha e da resina de *A. cearensis* sobre a formação desta estrutura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta de material

O estudo foi desenvolvido nas Regiões das Bacias Leiteiras de Alagoas e Pernambuco. Foram selecionadas 14 propriedades, sendo 10 localizadas no Estado de Alagoas, (Fig.2) entre os municípios de Batalha, Cacimbinhas, Major Isidoro e Minador do Negrão.

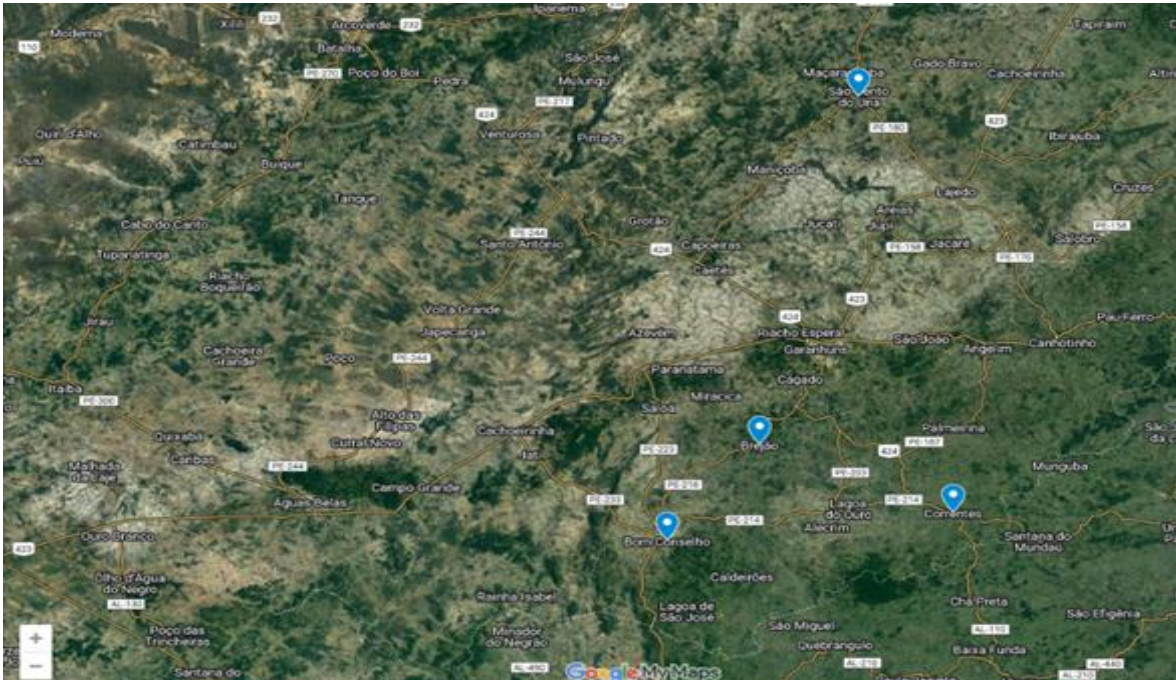
Figura 2. Mapa localizando as cidades de Alagoas onde ficam localizadas as propriedades.



Fonte: (Google 2022)

O Estado de Pernambuco, foram 4 propriedades divididas entre os municípios de Bom Conselho, Brejão, Correntes (PE), e São Bento do Una (PE), que utilizavam sistema de ordenha mecânica e forneciam leite para um laticínio sob inspeção federal. Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças, idades e em diferentes estágios de lactação, criados em sistema semi-intensivo. (Fig. 3).

Figura 3: Mapa exibindo municípios de Pernambuco onde foram realizadas os estudos.



Fonte: (Google 2022)

No período de setembro de 2017 a janeiro de 2018 foram realizados os testes de caneca telada e CMT em 1.405 vacas e coletadas as amostras CMT positivo a partir de 2+, totalizando 1.289 amostras. A coleta foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (2004). Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) foram utilizados tubos de ensaio esterilizados para acondicionar amostras individuais de 2 a 5 mL de leite, de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Os tubos contendo as amostras foram colocados em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável e levados ao laboratório de inspeção e saúde pública da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4.2. Isolamento de *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP)

Para a realização da cultura primária, uma pequena alíquota (0,5µL) de cada amostra foi plaqueada pela técnica de semeadura em estrias por esgotamento em Ágar Sangue de ovino a 5% e incubados em estufa a 37°C; foram realizadas leituras com 24 e 48 horas. As características macroscópicas e microscópicas (morfo-

tintóricas) das colônias foram avaliadas utilizando a técnica de Gram (CARTER, 1998). Testes de catalase e coagulase foram realizados para a identificação de SCP, utilizando-se como controle positivo na pesquisa a cepa *S. aureus* ATCC 29213.

4.3. Testes de suscetibilidade de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) a Oxacilina por Disco-difusão em ágar

Staphylococcus coagulase positiva foram submetidos a testes de sensibilidade ao antibiótico padrão (Oxacilina), avaliada pelo método de difusão em disco, seguindo a norma do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2018). As cepas de SCP isoladas e identificadas foram inoculadas em 2mL de meio caldo cérebro coração (BHI) e incubadas a 37° C por 24 h. Em seguida, foram submetidas à realização de antibiograma em placas de Petri, contendo Agar Müller Hinton. A sensibilidade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer e os resultados foram classificados como resistente (R), sensibilidade intermediária (I) e sensível (S), de acordo com tabela de suscetibilidade definida para isolados de origem veterinária disponibilizado pelo CLSI (CLSI, 2018).

4.4 Caracterização da produção do biofilme de *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP) resistentes a Oxacilina - Quantificação do Biofilme

A quantificação da produção de biofilmes "*in vitro*" foi determinada de acordo com o método citado por Merino et al., (2009), com modificações. Os isolados de SCP foram cultivados em TSB (Tryptone Soya Broth) por 24 horas a 37°C. Logo após, uma porção de cada cultivo foi diluída a 1:40 em TSB adicionado de 0,25% de glicose. Cada amostra, já padronizada, foi colocada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo em "U", em triplicata, junto com controles, no volume de 200µL/cavidade. Após o período de incubação (37°C por 24h), as placas foram lavadas três vezes com água destilada, e deixadas secar à temperatura ambiente. Foram adicionados 200µL de cristal violeta/cavidade, e a placa foi incubada por 2-3 minutos a temperatura ambiente. Logo após, cada cavidade foi lavada três vezes com água destilada e acrescida de álcool-acetona (80:20). As placas coradas com cristal violeta foram submetidas à espectrofotometria em leitor

de microplaca modelo EXPERT PLUS-UV para aferir as respectivas absorvâncias de cada cavidade. A absorvância foi determinada à 620 nm. Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco e as cepas controles utilizadas foram ATCC 12228 (negativa) e ATCC 25923 (positiva). De acordo com Stepanovic et al. (2003) o controle negativo (OD) é usado como base para os cálculos da determinação dos parâmetros para considerar um isolado produtor ou não de biofilme (OD_c). Deste modo, os isolados foram classificados de acordo com a seguinte regra: $OD \leq OD_c$ = não produtor, $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$ = fraco produtor, $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$ = moderado produtor, $(4 \times OD_c) < OD$ = forte produtor.

4.6 Caracterização genotípica dos isolados

Foi realizado PRC para investigar a existência de genes *nuc*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *icaA* e *icaD*. Para isto, foi utilizado o protocolo rotina do laboratório Biotecnologia adaptado dos protocolos descritos por Regitano (2001).

Para extração e purificação do DNA foram adicionados 500 μ L de Solução B, que é composta por Tris HCl (pH 8,0), que é uma solução tampão que tem por finalidade manter o pH constante; SDS, um detergente iônico forte, que vai romper as membranas celulares; o EDTA para quelar íons de magnésio e cálcio, que são cofatores de diversas enzimas, tais como as DNases; e a proteinase K para hidrolisar as proteínas. As amostras foram vortexadas até o pellet ser desprendido do fundo do microtubo e posteriormente incubadas a 55°C overnight em bloco aquecido com agitador. Após a incubação, foi adicionado 210 μ L de TE (pH 7,6), que é um tampão, permitindo que o pH da solução permaneça constante; além disso, foi adicionado 240 μ L de NaCl 5M, para promover a desnaturação e precipitação das proteínas por excesso de íons. A solução foi misturada por inversão e incubada em gelo por 10 minutos. Em seguida foi centrifugada a 16000xg por 15 minutos. Recuperou-se o sobrenadante, onde este foi dividido em dois tubos, cada um com no máximo 500 μ L. Adicionou-se 1mL de etanol absoluto gelado em cada tudo e misturou-se por inversão. Essa relação de 2:1 de etanol e sobrenadante é importante para que o DNA seja precipitado de forma efetiva. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 16000xg e após centrifugação, o sobrenadante foram descartados, e os microtubos foram colocados invertidos em papel para secar. Em

seguida, foi adicionado 500µL de etanol 70% para retirar os resquícios de sais do pellet, pois esses sais podem dificultar a ressuspensão do DNA. O sobrenadante foi descartado novamente e o microtubo foi colocado invertido em papel para secar. Por fim, foi adicionado 250µL de TE + RNase, pois a medida que o DNA é isolado, junto com ele fica uma quantidade considerável de RNA. As amostras foram então incubadas a 37°C por 1 hora e em seguida armazenadas em freezer para posterior utilização.

As reações para caracterização genotípica dos isolados foram executadas nas condições descritas no Apendice A, e a presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em 2% de gel de agarose corado com brometo de etídio. As amostras foram preparadas utilizando 10ul de amostra mais 2ul de tampão de corrida 6X. A corrida teve duração de 2h a 80V, 170mA e 20A. Foram utilizados marcadores de pesos moleculares que variaram de acordo com o gene pesquisado (tabela 1).

Tabela 1. Genes pesquisados, controles e sequências de nucleotídeos dos primers utilizados nas reações de PCR.

Gene	Primer	Sequência dos primers	Tamanho do produto (pb)	Controle +
nuc	F	GAGATTGATGGTGATACGGT	279PB	ATCC 25923 S. aureus
	R	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC		
blaZ	F	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	517pb	ATCC 33591 S. aureus
	R	GCTTGACCACTTTTATCACG		
mecA	F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533pb	ATCC 33591 S. aureus
	R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
mecC	F	TCACCAGGTTCAACYCAAAA	355pb	MEC-C 1
	R	CCTGAATCWGCTAATAATA		
icaA	F	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315pb	ATCC12600 S. aureus
	R	AAGATAATGCGATAAGTGG		
icaD	F	GCGATTGATGGTGATACGGTT	230pb	ATCC 12600 S. aureus
	R	AGCCAAGCCTTGACGAAGCTAAAGC		

Fonte: NUC: KETEETE, et al. 2010. BlaZ: SAWANT; GILLESPIE; OLIVER (2009); IcaA e IcaD:

VASUDEVAN, et al. (2003); MecA: AWANT, et al. (2009). MecC : GARCÍA-ÁLVAREZ, et al. (2011).

4.7 Atividade Antimicrobiana pelo método de Microdiluição em caldo

Para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias foi realizada a análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Extrato de Própolis Vermelha e da Resina de Umburana. O teste foi realizado por meio da Técnica de Microdiluição, empregando-se a metodologia descrita pelo CLSI (2014) seguindo as descrições do protocolo M07-A9. A bactéria foi turvada a partir da leitura da densidade óptica (DO), no comprimento de onda de 546 nm, em espectrofotômetro para a obtenção do valor da DO de 0,036 correspondente a escala de 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Em seguida 100 μ l desta foram transferidos para um tubo contendo 9,9 mL de MH caldo, no qual 20 μ l desta solução foram utilizados para avaliar o efeito bactericida.

Para isso, foram preparadas soluções estoque das substâncias em estudo, Própolis Vermelha (6.250 μ g/mL) e Resina de Umburana (25.000 μ g/mL), as quais foram diluídas em água destilada autoclavada e dimetilsufóxido (DMSO - Dimethyl sulfoxide) 10% e água destilada autoclavada e Tween 20 (10%), respectivamente.

Na microplaca de 96 poços foram adicionados 100 μ l de caldo Mueller Hinton (MH) mais 100 μ l das soluções contendo a substância, em seguida, foram feitas as diluições seriadas na vertical. A atividade antimicrobiana das substâncias foi estimada analisando-se a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM), as quais foram determinadas seguindo as descrições do documento CLSI (2014) nas concentrações de 3.125; 1.562 ; 781,25; 390,62 ; 195,31; 97,66; 48,83; 24,41; 12,21; 6,10; 3,05 e 1,52 μ g/mL para o extrato hidroalcolico de própolis; e nas concentrações de 12.500; 6.250; 3.125; 1.562; 781,25.; 390,62; 195,31; e 97,66 μ g/mL para a resina de umburana; em triplicata, de acordo com o documento M100-S20.

Ao final foi acrescentado em cada poço da placa de microdiluição 10 μ L (1×10^4 UFC/mL) da suspensão contendo o inócuo. Após 24 horas de incubação á 37°C foi feito o repique para uma placa de petri G contendo MH ágar com auxílio de um replicador de microplacas e em seguida colocada novamente para incubação. Após este passo 20 μ l do CTT (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) foi adicionado nos

micropoços para verificar a viabilidade das colônias, sendo a coloração avermelhada indicativo de atividade oxidativa da bactéria (análise da CIM). As placas de Petri G com as alíquotas repicadas do material foram incubado a 37 °C por 24 horas e a CBM determinada como a menor concentração do EHP e da resina de umburana que causou a morte do microrganismo testado. Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados anotados em uma planilha para posterior análise.

4.8 Atividade Anti-biofilme

4.8.1 Interferência do EHP e da resina de umburana com o biofilme bacteriano em formação.

O protocolo de interferência com a formação do Biofilme se baseou na metodologia de Nostro e colaboradores (2007) com modificações. Primeiramente, os inócuos bacterianos foram cultivados em tubos contendo 3 mL de TSBg 0,25%, por 24 h a 37 °C. Após este tempo 100 µl deste cultivo foram acrescidos em uma microplaca de 96 poços juntamente com 100 µl da solução da substância antimicrobiana contendo o equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição em placa. Após 24 h de incubação a 37 °C, as microplacas foram submetidas a lavagem com 200 µl de água destilada três vezes. Em seguida, os poços foram corados com 100 µl de violeta de genciana 0,25% por 5 minutos. Todos os poços foram novamente lavados três vezes com 200 µl de água destilada. Por fim, utilizou-se 200 µl de álcool-acetona (80:20) para fazer a análise da absorbância em leitor de microplaca modelo EXPERT PLUS-UV e mensurada em 620 nm. A interferência na formação do biofilme foi feita com base nos registros de quantificação do biofilme antes e após a adição da substância teste.

4.8.2 Interferência do EHP e da resina de umburana com o biofilme bacteriano consolidado

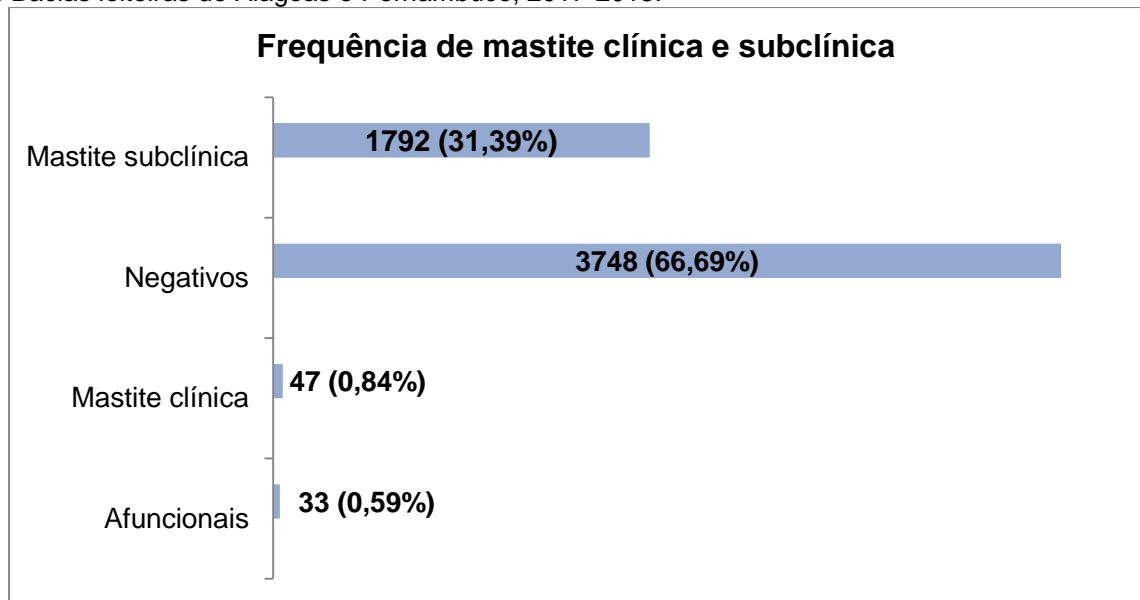
No biofilme Consolidado 100 µL do inóculo bacteriano foram incubados em microplacas por 24h a 37°C, sendo feita uma primeira leitura a 0h após a lavagem com 200 µl de água destilada estéril três vezes, a fim de retirar a população de

células não aderidas. Em seguida 200 μ L da solução contendo a substância isolada, equivalente à metade do valor de CBM observado na microdiluição em placa, foi acrescida e posteriormente incubadas por 24hs, sendo, então, feita a leitura à 24hs. Após o registro das DO's foi feita a média das triplicatas e de posse desse valor dividiu-se a DO de 0h pela de 24h e o resultado foi multiplicado por 100 para verificação da porcentagem de interferência com o biofilme consolidado. Como controle negativo foi utilizada o meio TBSg, sendo também utilizado como controle do processo a fim de se avaliar uma provável contaminação (adaptado de NOSTRO et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 5.620 quartos mamários avaliados, 0,59% (33/5620) eram afuncionais, 0,83% (47/5620) apresentaram mastite clínica, 66,69% (3748/5620) foram negativos ao teste CMT e 31,89% (1792/5620) apresentaram mastite subclínica.

Figura 4. Frequência de mastite clínica e subclínica em vacas provenientes de rebanhos da região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2017-2018.

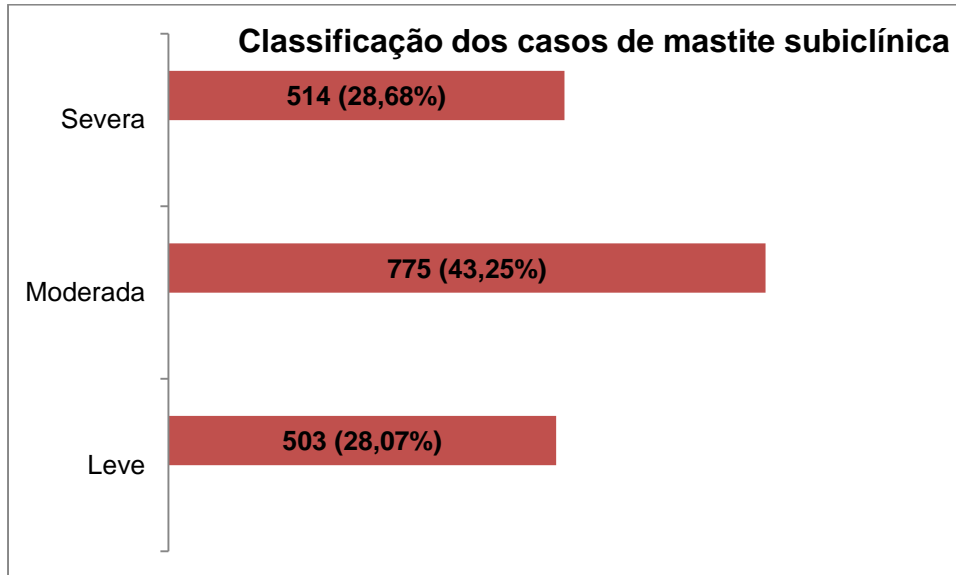


Destes últimos, 28,07% (503/1792) foram classificados como mastite leve (+), 43,24% (775/1792) moderada (++) e 28,69% (514/1792) severa (+++).

Contudo para este estudo foram colhidas apenas amostras de leite dos quartos mamários que apresentaram mastite subclínica moderada e severa, totalizando 1.289 amostras. Este índice elevado de ocorrência de mastite, principalmente subclínica, pode ser atribuído às más condições de higiene dos ordenhadores, a falta de higiene durante a ordenha e a ausência de realização de práticas de controle e prevenção no que diz respeito à mastite bovina. O papel do ordenhador é considerado fator crucial na propriedade leiteira, a sua falta de conhecimento em relação à doença, problemas com o saneamento ambiental da área de criação e o manejo inadequado dos animais no período durante a ordenha

são os principais fatores de risco identificados e estes devem ser corrigidos para reduzir os casos da doença e otimizar a produção de leite no país (ACOSTA et al., 2016).

Figura 5. Classificação dos casos de mastite subclínica em vacas provenientes de rebanhos da região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2017-2018.



As frequências de mastite observadas nesse estudo indicam a ocorrência de falhas de manejo que contribuem para a ocorrência da referida doença e demonstra a necessidade de implantação de um programa de controle para a enfermidade nas propriedades estudadas. Uma vez que o teste da caneca telada diariamente era realizado apenas em uma das propriedades, em nenhuma delas era utilizada a linha de ordenha. Em todas as propriedades era realizado o tratamento dos casos de mastite clínica, porém em apenas duas era realizada a terapia da vaca seca, o que significa que na maior parte das propriedades os animais acometidos por mastite subclínica permanecem no rebanho, favorecendo assim a disseminação dos agentes patogênicos.

Os resultados obtidos neste estudo, foram semelhantes aos obtidos por Ribeiro et al. (2006), em unidades de produção leiteira no Sul do Rio grande do Sul, onde 1,2% dos quartos mamários em lactação apresentaram mastite clínica e 31,2% mastite subclínica. A frequência de mastite clínica obtida neste trabalho também foi semelhante a obtida por Oliveira et al. (2011), na bacia leiteira de Rondon no estado do Pará 1,3%; nesse mesmo estudo Oliveira et al. (2011), relataram 6,6% de frequência para a mastite subclínica, valor muito inferior ao encontrado neste projeto.

As frequências de mastite clínica e subclínica obtidas com esse estudo, foram inferiores aos obtidos por Martins et al. (2010), na microrregião de Cuiabá - MT, onde verificou-se a presença de mastite clínica e subclínica em 5,8% e 65,0% dos quartos mamários, respectivamente; e aos resultados verificados por Bueno et al. (2002), em propriedades localizadas em Pirassununga - SP, onde observou-se presença de mastites clínicas em 7,4% e subclínicas em 63,6% dos quartos mamários. A frequência de casos de mastite subclínica observada nesse estudo encontra-se além dos índices considerados toleráveis, pois Ribeiro et al. (2006), citam que um controle adequado de mastites deve atingir níveis de ocorrência inferiores a 1% do rebanho para a forma clínica e 15% para a forma subclínica. Segundo Brito e Brito (1996), a mastite bovina é o maior problema de origem sanitária e sua prevalência nos rebanhos nacionais varia de 11% a 58%. A mastite subclínica é uma doença constante e um fator preocupante na produção leiteira, visto que não pode ser identificada por exames físicos habituais. Dessa forma, observa-se a relevância estatística quanto a mastite subclínica nos rebanhos e a fundamental importância das análises microbiológicas do leite com certa frequência, para que diminua o risco de depreciação deste produto e não cause danos à saúde do consumidor.

A mastite pode ser controlada por condições higiênicas em rebanhos, como manter animais longe da água estagnada, uso de solução desinfetante no úbere antes de ordenhar e descarte de animais (KALI WAL e KURJOGI, 2011). Para controlar a mastite dentro dos rebanhos é necessário que se adote medidas sanitárias rigorosas. As práticas do pré *dipping* e pós *dipping*, assim como, o isolamento microbiano dos animais considerados assintomáticos, devem ser consideradas como práticas rotineiras nas propriedades produtoras de leite (ARTUSSON et al., 2016).

De acordo com Langoni et al. (2017), o impacto das mastites na produção de leite está diretamente relacionado ao grau de lesão do tecido mamário, sendo maiores as alterações nos componentes do leite e mais elevadas as contagens de células somáticas (CCS), já a redução na produção de leite deve-se à lesão de células epiteliais secretoras da glândula mamária infectada. Outro fator importante é o tratamento dos animais acometidos, seja durante a lactação ou no período de secagem, o sucesso dessas medidas depende de alguns aspectos importantes, como escolha do medicamento adequado, da distribuição dos ativos dentro da

glândula mamária, do estado fisiológico do animal, da precocidade com que a terapêutica de tratamento é estabelecida e de qual microrganismo está envolvido. Desta maneira, é muito importante identificar os patógenos envolvidos e usar os medicamentos que tenham melhor efeito, visto que microrganismos de uma mesma espécie, dentro do mesmo rebanho, podem ter sensibilidades distintas (COSTA et al., 2013).

Do total de amostras de leite analisadas após cultivo e identificação microbiológica, foram isolados 337 *Staphylococcus* spp. dos quais 179 foram classificados com *Staphylococcus* coagulase positiva. Medeiros e Souza (2009), analisaram 16 propriedades em São Paulo, onde encontraram 15,0% de *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite de quartos mamários com mastite. De acordo com Pinheiro de Sá et al. (2000) o microrganismo mais comum nas amostras foi *Staphylococcus* spp., (32,6%).

A múltipla etiologia da mastite contribui para o elevado impacto sobre a produção leiteira, dentre os agentes responsáveis por esta enfermidade, destacam-se bactérias do gênero *Staphylococcus*, que são os agentes etiológicos mais importantes nas mastites bovinas (BARDIAU et al., 2016). Em algumas regiões a adoção de programas de controle rígido, incluindo descarte de vacas repetidoras de mastite por este microrganismo propiciaram redução significativa na sua prevalência. Uma característica importante e que influencia no tratamento das mastites é que este patógeno coloniza o epitélio do teto, fixando-se nas células epiteliais da glândula mamária dificultando a ação dos antimicrobianos. As glândulas infectadas diminuem a produção de leite pela destruição permanente do parênquima, originando áreas de fibrose e micro abscessos que protegem o agente dos mecanismos de defesa do úbere, como a fagocitose pelos neutrófilos (RIBEIRO et al., 2016).

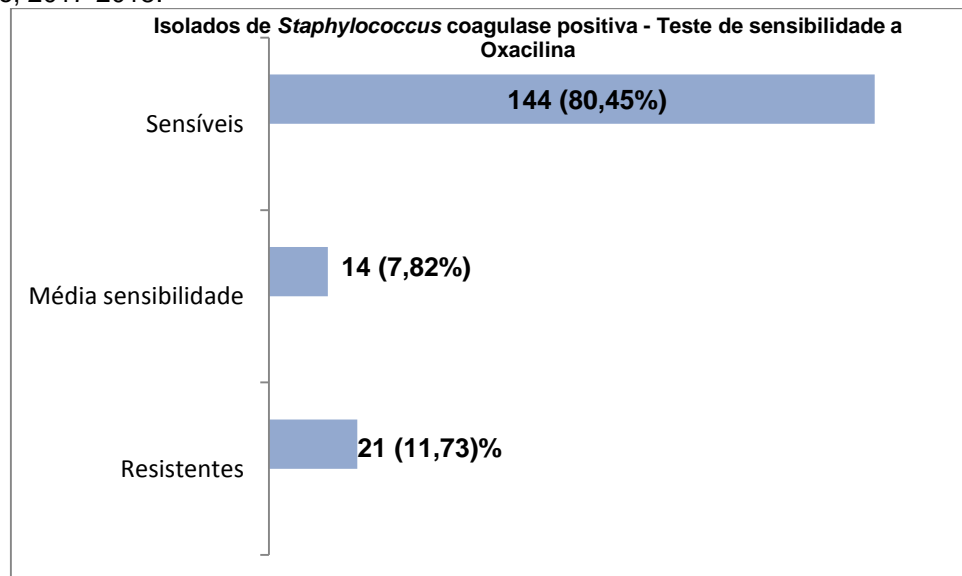
Os 179 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, foram submetidos ao teste de sensibilidade ao antibiótico padrão (Oxacilina), pelo método de difusão em disco, onde 11,73% (21/179) foram resistentes (R), 7,82% (14/179) apresentaram sensibilidade intermediária (I) e 80,45% (144/179) foram sensíveis (S) ao referido antibiótico.

A resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase positivo, em especial *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), que é resistente a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, é um grande desafio, no que diz respeito ao aparecimento de cepas resistentes à terapia antimicrobiana usual (MIMICA, 2012).

Embora a metilina não seja mais produzida, o termo MRSA persistiu e pode ser considerado como uma referência à resistência a praticamente todos os antibióticos β -lactâmicos, sendo o teste de suscetibilidade realizado com a oxacilina e / ou cefoxitina (PATERSON et al., 2014).

Os resistentes à metilina apresentam uma relevância particular, pois no genoma dessas bactérias pode-se encontrar o gene de resistência *mecA*, que codifica para a produção de uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP) (PBP2a ou PBP2') com baixa afinidade para todos os beta-lactâmicos antimicrobianos (KWON et al., 2006; FERREIRA et al., 2010). O gene de resistência responsável pela codificação de betalactamases em *S. aureus* é o *blaZ*, que pode estar presente no cromossomo, em plasmídeos ou em transposons (BIGNARDI et al., 1996; LI et al., 2007). O gene *mecC* representa uma forma recentemente conhecida de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), que codifica um gene *mec* divergente, capaz de causar infecções em humanos e em outras espécies hospedeiras (PATERSON et al., 2014).

Figura 6. Sensibilidade a oxacilina, dos isolados de *Staphylococcus coagulase positiva*, provenientes de casos de mastite subclínica em vacas, de rebanhos na região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2017-2018.



Staphylococcus Coagulase Positiva (SCP) resistentes a oxacilina, foram submetidos ao teste de aderência em microplacas para quantificação do biofilme, onde 100% (21/21) demonstraram capacidade de formar biofilme. Esta capacidade de produção de biofilme pode estar relacionada ao potencial dos isolados causarem

infecções crônicas e de difícil tratamento, pois acredita-se que a capacidade de formar biofilme, seja uma forma através da qual os microrganismos fogem do sistema imunológico, conseguindo se manter no interior da glândula mamária, causando infecções persistentes. Resultado semelhante foi observado em estudo desenvolvido por Melo et al., (2012), ao avaliarem a produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina, provenientes de dois rebanhos no estado de São Paulo, no qual 98,9% das estirpes se aderiram à placa e foram consideradas produtoras de biofilmes. Noel et al. (2016), ao estudarem a produção de “Slime” de isolados de *Staphylococcus spp.* provenientes de casos de mastite bovina na Região Sul-Fluminense, também detectaram a produção de biofilme na técnica da microplaca, em 74,4% dos isolados.

A patogênese da mastite é atribuída à combinação de diversos fatores celulares e extracelulares, sendo a formação de biofilme um dos principais mecanismos para a infecção bacteriana persistente ou crônica (COSTERTON et al. 1999). Jain e Agarwal (2009) descreveram que a formação de biofilme é um fator de virulência importante para diversas bactérias, inclusive *Staphylococcus spp.*

Além da habilidade dos *Staphylococcus* produzirem biofilmes ser um dos fatores de virulência para a mastite, também são um problema em relação ao tratamento das infecções, por permitir que os microrganismos fiquem protegidos da ação de antimicrobianos, desinfetantes e da fagocitose pelo sistema imune, o que torna a mastite subclínica persistente (MELO, 2008). Essa proteção geralmente está associada ao fato de que, no biofilme os microrganismos estão envolvidos pela matriz de exopolissacarídeos, a qual impede que as substâncias químicas e as células de defesa tenham acesso às células microbianas.

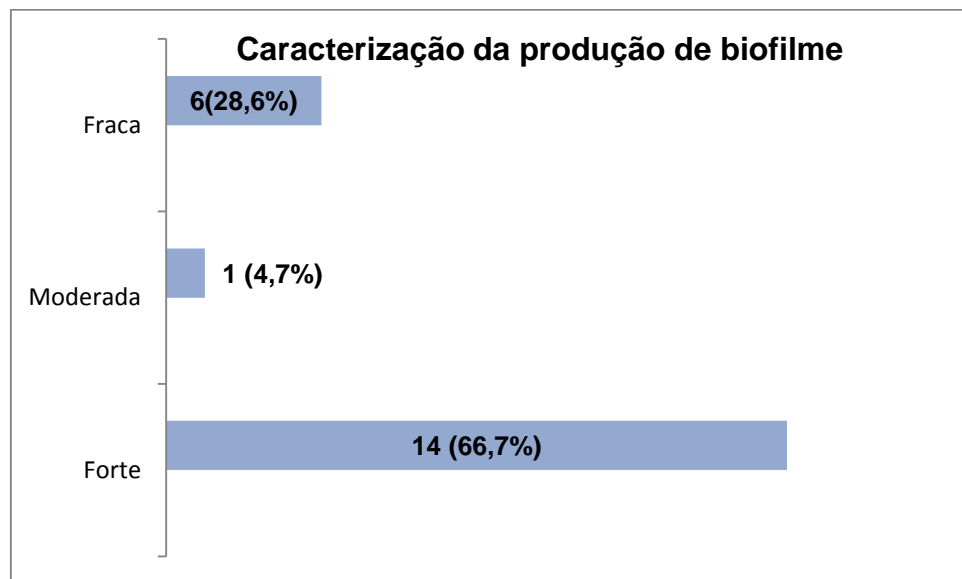
Das 21 amostras que apresentaram capacidade de produção de biofilmes, 66,7% (14/21) apresentaram-se como fortes produtoras, enquanto 4,7% (1/21) e 28,6% (6/21) demonstraram formação moderada e fraca, respectivamente, o que pode estar relacionado às diferentes espécies de *Staphylococcus coagulase positiva* existentes e que não haviam sido identificadas até essa etapa do estudo.

Em estudo realizado por Noel et al. (2016), sobre a produção de biofilme de isolados de *Staphylococcus spp.* provenientes de casos de mastite bovina na Região Sul-Fluminense, não foram observados isolados com capacidade de produção de biofilme fraca e moderada, sendo 65% dos isolados classificados como forte

produtores e 35% como fracos produtores e foi possível observar que diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. foram capazes de formar biofilme. Melo et al., (2012); estudando a produção de biofilmes por *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina, provenientes do estado de São Paulo, obtiveram resultados diferentes dos aqui observados, pois verificaram que a maioria (98,9%) das estirpes de *S. aureus* estudadas, se aderiram fortemente à placa de poliestireno.

Stepanovic et al. (2000), ressaltam que o teste de aderência em placas é um dos métodos usados com maior frequência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos por *Staphylococcus* spp., além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos microrganismos. Este teste cora a matriz de exopolissacarídeo produzida pelos *Staphylococcus* sendo então possível verificar se as estirpes são boas formadoras de biofilme ou não (MELO et al., 2012).

Figura 7. Caracterização de biofilme produzidos por isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva causadores de mastite subclínica em vacas na região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2017-2018.



Ainda em relação a *Staphylococcus* spp. a produção do biofilme é o principal fator de patogenicidade e resistência no qual as células, devidamente organizadas, ficam protegidas por uma matriz polimérica evitando a entrada dos antibióticos para exercerem sua ação (ARCHER et al., 2011; LÓPEZ et al., 2010). A obtenção de genes de resistência em um agregado microbiano pode acontecer por meio da mudança horizontal de genes entre diversas espécies e gêneros. O alcance de recentes sequências de DNA (ácido desoxirribonucléico) sucede mediante as fases

de conjugação, transdução e transformação, garantindo a bactéria uma forma acelerada de evolução, obtendo genes que possibilitam sua acomodação a um recente meio, assim como a propagação de genes entre as comunidades bacterianas (VON WINTERSDORFF *et al.*, 2016).

Após caracterização genotípica dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, classificados como fortes e moderado formadores de biofilme, verificou-se que 100%(15/15) foram positivos para a presença do gene *nuc*, identificando-os como *Staphylococcus aureus*, reforçando a sua importância como patógeno da mastite em bovinos. *Staphylococcus aureus* é reconhecido como importante causador de quadros agudos e crônicos da mastite bovina. A cronicidade dessa doença está ligada a vários fatores de virulência, entre os quais: formação de biofilme, sobrevivência intracelular e expressão de genes (BARDIAU *et al.*, 2016).

Observou-se ainda que 86,7% (13/15) isolados foram positivos para a presença do gene *blaZ*, responsável pela resistência aos β -lactâmicos e 100%(15/15) negativos para a presença do gene *mecA* e *mecC*, responsáveis pela resistência à meticilina. Outros autores observaram que todos os isolados de MRSA mostraram o mesmo padrão de resistência aos β -lactâmicos, sendo estes positivos tanto para o gene *mecA* quanto para o gene *blaZ*, que são genes comumente detectados em *S. aureus* de animais (SCHWARZ *et al.*, 2014; WENDLANDT *et al.*, 2013). A ausência dos genes *mecA* e *mecC* nos isolados sugere a existência de um diferente mecanismo de resistência à beta lactâmicos (SILVA *et al.*, 2016)

A maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* apresentaram genes *icaA*, *icaD*. Sendo 73,3% (11/15) das amostras com presença do gene *IcaA* e as mesmas 73,3% (11/15) com gene *IcaD*. A presença do locus *ica* em isolados de mastite por *S. aureus* confirma seu potencial papel como fator de virulência na patogênese da mastite em ruminantes (MELO *et al.*, 2013). O gene *icaA*, assim como *IcaD*, estiveram presentes em 95,7% das estirpes de *S. aureus* isolados de casos de mastite subclínica, em pesquisa realizada por Melo *et al.* (2012), o que demonstra potencial ação de produção de biofilmes. Segundo Kronung *et al.*, (2016) a presença dos genes *IcaD*, confirma que os isolados têm potencial genético de formar biofilme. Krewer *et al.* (2015) detectaram a presença do gene *icaD* em 92,2% dos 210 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de bovinos com mastite subclínica na região nordeste.

Tabela 2. Resultado da pesquisa dos genes *nuc*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *icaA* e *icaD* em isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* causadores de mastite subclínica em vacas na região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2019.

Identificação do isolado de SCP	Gene					
	<i>nuc</i>	<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>
07PE	+	+	-	-	-	-
13PE	+	+	-	-	+	+
15PE	+	+	-	-	+	+
20PE	+	+	-	-	+	+
23PE	+	+	-	-	+	+
25PE	+	+	-	-	+	+
29PE	+	+	-	-	+	+
99AL	+	+	-	-	+	+
103AL	+	+	-	-	+	+
105AL	+	+	-	-	+	+
166AL	+	+	-	-	+	+
170AL	+	-	-	-	-	-
179AL	+	+	-	-	-	-
185AL	+	-	-	-	-	-
190AL	+	+	-	-	+	+

As mastites causadas pelo *S. aureus* são caracterizadas por apresentarem baixa resposta ao tratamento e alta recidiva, quando comparado a outros microrganismos, e este fenômeno pode estar associado à habilidade de produzir biofilme (SZWEDA et al., 2014). A taxa de cura da mastite causada por *Staphylococcus aureus* com antibioticoterapia durante a lactação é muito baixa. Muitos animais infectados que tornam-se crônico, são encaminhados ao abate (KULKARNI e KALIWAL, 2013). A indicação do tratamento de longa duração, ou terapia estendida, tem melhorado a resposta ao tratamento em casos de mastite por *S. aureus*, no entanto, com 30-50% de cura. Do ponto de vista do manejo dos animais, devido à alta contagiosidade deste patógeno, sua persistência no rebanho e custo em função ao tratamento, muitas vezes, o descarte do animal tem sido priorizado a fim de controlar os casos de mastite em propriedades. As medidas de controle são muito importantes para contribuir com a redução de casos de mastite

por este patógeno (LANGONI et al., 2017).

O monitoramento da resistência em *S. aureus* é importante, pois o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no incremento das taxas de resistência (COSTA et al., 2013).

A ocorrência natural desse patógeno em glândulas mamárias de vacas, como agente etiológico de mastites, também contribui para sua ocorrência no leite e derivados. Desse modo, além de causador da mastite, esses microrganismos em números elevados representam risco potencial para saúde do homem, uma vez que produzem enterotoxinas termoestáveis que podem causar intoxicação alimentar (OLIVEIRA et al., 2011). Além da produção de enterotoxinas, uma característica importante de *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes, tanto em superfícies biológicas, quanto inertes. Em muitos casos clínicos a resposta imune do hospedeiro contra infecções persistentes é ineficaz, podendo levar a um quadro de doença crônica (ARCHER et al., 2011). O biofilme confere proteção contra as defesas do sistema imune do hospedeiro, assim como da ação dos antibióticos (BOZIC et al., 2014).

Diante disso, a utilização de compostos de origem natural associados a antibióticos tem sido uma alternativa para o controle da patogenicidade causada por cepas produtoras de biofilme em diferentes situações clínicas, havendo um efeito sinérgico, onde essa combinação permite o aumento do espectro de ação do antibiótico, a redução da toxicidade deste, o uso de baixas doses da droga e a prevenção da seleção de bactérias resistentes durante a terapia. Isso permite uma interferência em diferentes alvos do biofilme, e os compostos naturais podem ter ação tanto antibiótica como imunomodulatória, além da ação sobre a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme (COS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016).

Com a finalidade de combater esta organização celular ou resistência na comunidade microbiana altas doses do antibiótico são requeridas. Diante disso, as alternativas para o tratamento de infecções causadas por bactérias formadoras de biofilme estão entre as novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos com ação anti-biofilme. Atualmente a utilização de compostos de origem natural ou sintética tem sido alternativas para o controle da patogenicidade causada por cepas produtoras de biofilme em diferentes situações clínicas. Estes compostos podem ter ação tanto antibiótica como imunomodulatória, além da ação sobre a expressão de genes envolvidos na formação do biofilme (COS et al., 2006; RIBEIRO et al., 2016).

Dessa forma, despertou-se para a necessidade de avaliar o potencial efeito antimicrobiano da própolis vermelha e da resina de umburana. Os valores referentes a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para essas substâncias estão descritos na tabela 3.

A CIM é um método laboratorial utilizado para diagnóstico de confirmação de resistência, considerada o padrão ouro para determinar a susceptibilidade de organismos aos antimicrobianos (ANDREWS 2001), representando a concentração mínima da substância necessária para inibir o crescimento microbiano. Na Tabela 3, observam-se valores de CIM variando de 3,125 até 781,25 µg/mL para a própolis vermelha e valores de CIM mais elevadas para a resina de umburana com variação de 195,31 até 390,62 µg/mL.

A CBM é definida como a menor concentração necessária para matar 99,9% das bactérias planctônicas em crescimento, sendo uma alternativa laboratorial para verificar o possível efeito antimicrobiano dos compostos que estão sendo estudados (FLETCHER et al., 2014). Nesse estudo a Própolis vermelha apresentou uma CBM variando de 3,125 até 1.565,50 µg/mL, enquanto a CBM para a resina de umburana variou de 195,31 até 781,25 µg/mL (tabela 3).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) da Própolis Vermelha e da Resina de *Amburana cearensis* frente aos isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* causadores de mastite subclínica em vacas na região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2019.

Identificação do isolado de SCP	Própolis Vermelha		Resina de Umburana	
	CIM(µg/mL)	CBM(µg/mL)	CIM(µg/mL)	CBM (µg/mL)
20PE	390,6	3.125	390,62	781,25
105AL	48,83	390,62	195,31	195,31
170AL	6,10	195,31	195,31	390,62
07PE	24,41	781,25	390,62	781,25
99AL	48,83	97,66	195,31	390,62
15PE	12,21	781,25	390,62	390,62
190AL	6,10	48,83	195,31	390,62
13PE	12,21	390,62	195,31	781,25
25PE	195,31	1.565,50	390,62	390,62
29PE	781,25	97,66	390,62	781,25

23PE	97,66	195,31	390,62	781,25
179AL	12,21	390,62	390,62	390,62
166AL	12,21	97,66	195,31	781,25
103AL	12,21	48,83	195,31	195,31
185AL	48,83	12,21	195,31	781,25
ATCC25923	3,125	3,125	390,62	390,62

Os resultados deste estudo com a própolis vermelha, foram superiores ao de Bispo Junior *et al.* (2012) que observaram CIM de 0,7 mg/mL para o extrato etanólico de própolis e de Cabral *et al.* (2009) que observaram CIM entre 62,5 e 125 µg/mL e CBM entre 250 e 500 µg/mL. As menores concentrações foram semelhantes aqui obtidas foram semelhantes as obtidas por Daugsch *et al.* (2007), que observaram concentrações próximas a 2,5 µg/mL. A sensibilidade de cepas de *S. aureus* à própolis corroborou com Fernandes Junior *et al.* (2006), e com Moura (2019) que o testaram com a cepa multirresistente *S. aureus* ATCC 33591. Estes resultados se devem à atividade antimicrobiana da própolis, com destaque à sua ação sobre *S. aureus* (PINTO *et al.*, 2001; FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2003). Não foram encontrados estudos avaliando a atividade antimicrobiana da resina de umburana com as concentrações de CIM e CBM para compararmos com os resultados obtidos nesse estudo.

Todas as cepas avaliadas apresentaram sensibilidade às substâncias testadas, demonstrando a necessidade do aprofundamento a respeito dos estudos envolvendo a própolis vermelha e a resina de umburana em relação a atividade antimicrobiana das mesmas, além da problemática que envolve o aparecimento de bactérias resistentes. Mimica (2012), ressalta a importância da utilização de novas substâncias para a terapêutica contra bactérias resistentes aos antibióticos comumente utilizados na rotina clínica. Nos resultados apresentados, o extrato de própolis vermelha e a resina de umburana apresentaram boa atividade antimicrobiana, inclusive no isolado ATCC 25923, que é um isolado multirresistente (tabela 4).

Componentes naturais da própolis tem sido explorados para melhorar suas propriedades antimicrobianas. Sendo usado os extratos de própolis sozinhos ou em combinação com antimicrobianos (AFOUZAN, 2018). Todavia, o uso desses

compostos naturais associados com terapias alternativas também naturais poderiam garantir um melhor resultado e diminuir o uso de antimicrobiano, pois mesmo em doses mais baixas este uso ainda selecionam cepas resistentes.

Todos os isolados selecionados para realização do teste de atividade antimicrobiana, da própolis vermelha e da resina de umburana, nesse estudo foram produtores de biofilme, variando entre moderados e fortes produtores (tabela 4). Ao realizar o ensaio para se observar a influência do extrato dessas substâncias na formação do biofilme desses isolados, pode-se observar que as mesmas reduziram a produção de biofilme. Sendo a redução observada em 100% (15/15) das amostras com o uso da própolis vermelha e 86,7% (13/15) com a utilização da resina de umburana (tabela 4). Sendo um resultado relevante, visto que a produção de biofilme é um obstáculo para uma terapia clínica eficaz no tratamento de mastites causadas por estes microrganismos.

Tabela 4. Resultados da quantificação de biofilme e interferência sobre o biofilme em formação do extrato de própolis vermelha e da resina de *Amburana cearensis* em isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* causadores de mastite subclínica em vacas na região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2019.

Identificação do isolado de SCP	Antes	Após contato	
	Quantificação	Própolis Vermelha	Resina de Umburana
20PE	FORTE	FRACO	FRACO
105AL	FORTE	FRACO	FRACO
170AL	FORTE	FRACO	FRACO
07PE	FORTE	FRACO	FORTE
99AL	FORTE	FRACO	FRACO
15PE	FORTE	FRACO	MODERADO
190AL	FORTE	FRACO	MODERADO
13PE	FORTE	FRACO	FRACO
25PE	FORTE	FRACO	FRACO
29PE	MODERADO	FRACO	FORTE
23PE	FORTE	FRACO	FRACO
179AL	FORTE	FRACO	MODERADO
166AL	FORTE	FRACO	MODERADO
103AL	FORTE	NEGATIVO	FRACO

185AL	FORTE	FRACO	FRACO
ATCC25923	FORTE	NEGATIVO	FRACO
ATCC33591	FRACO	-	-

Com o uso da própolis vermelha, a amostra (1/15) que era moderada produtora de biofilme passou para fraca produtora e das amostras que eram fortes produtoras de biofilme (14/15), 92,9 % (13/14) passaram para fracas produtoras e 7,1% (1/14) apresentou resultado negativo para produção de biofilme. Já com a utilização da resina de umburana 71,4% (10/14) das amostras fortes produtoras de biofilme passaram a fracas produtoras e 28,6% (4/14), passaram para moderadas formadoras de biofilme (tabela 5). O que mostra que as substâncias interferiram diretamente na formação do biofilme. As substâncias em teste também interferiram na produção de biofilme pela ATCC25923 que era forte produtora e com o uso da própolis passou a negativa e a fraca produtora na presença da resina de umburana (tabela 5).

A eficácia do extrato de própolis vermelha e da resina de umburana no biofilme já consolidado também foi satisfatória (tabela 5), o que sugere a ação destas substâncias inovadoras contra esta estrutura de resistência, observando-se o promissor potencial anti-biofilme e antibacteriano destas substância e justificando a importância dos produtos naturais como agentes de inspiração para síntese de novos compostos com atividade biológica.

Tabela 5 – Interferência da própolis vermelha e da resina de *Amburana cearensis* sobre biofilme consolidado de isolados *Staphylococcus coagulase* positiva, causadores de mastite subclínica em vacas na região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2019.

Identificação do isolado de SCP	Interferência da Própolis Vermelha (%)	Interferência da Resina de Umburana (%)
20PE	104,25	138,25
105AL	103,66	86,82
170AL	105,07	107,69
07PE	89,36	104,84
99AL	98,32	111,54
15PE	103,52	83,93
190AL	51,65	92,37
13PE	104,49	126,60

25PE	104,15	74,85
29PE	106,21	133,33
23PE	80,81	109,30
179AL	101,08	138,46
166AL	101,83	100,33
103AL	94,30	96,48
185AL	103,21	145,70
ATCC25923	88,00	77,09

Uma alternativa é a combinação sinérgica entre o produto natural e o antibiótico. Muitas vezes este efeito sinérgico acontece entre drogas com mecanismos conhecidos de atividade antibacteriana e anti-biofilme; que atuam desestabilizando a matriz polimérica, enfraquecendo o sistema de comunicação bacteriana (*quorum-sensing*) ou mesmo matando a comunidade microbiana formadora do biofilme. As vantagens desta combinação são o aumento do espectro de ação do antibiótico, a redução da toxicidade deste, o uso de baixas doses da droga e a prevenção da seleção de bactérias resistentes durante a terapia. Isso permite uma interferência em diferentes alvos do biofilme (RIBEIRO et al., 2016).

Quando o biofilme está bem consolidado a penetração e a conseqüentemente destruição pelo o sistema imune do hospedeiro e dos antimicrobianos torna-se dificultada (WOLCOTT, 2010). Os resultados da ação das substâncias sobre o biofilme consolidado são bastante promissores, pois as principais pesquisas utilizando produtos naturais como potenciais fontes de substâncias antibiofilme restringem-se apenas a interferir com as etapas iniciais da formação do biofilme (CHUSRI; NA PHATTHALUNG; VORAVUTHIKUNCHAI, 2012; SALTA *et al.* 2013).

Os produtos naturais, tanto os compostos puros como extratos de plantas medicinais, são novas alternativas para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas e a síntese de novos fármacos tem conduzido a um aumento do interesse na “redescoberta” dos produtos naturais, bem como no melhoramento da eficiência do processo de síntese química. Contudo a complexidade destes produtos e a falta de garantia de um fornecimento renovável gera um certo desinteresse para a indústria farmacêutica. Todavia o uso dos conhecimentos etnofarmacológicos é uma alternativa para reduzir o empirismo e aumentar a probabilidade de sucesso no desenvolvimento de novas drogas de origem natural (CRAGG e NEWMAN, 2013;

COS et al., 2006; TAYLOR, 2013).

As fontes naturais oferecem possibilidade para descoberta de substâncias de interesse terapêutico, além disso, a biodiversidade brasileira representa uma enorme importância científica, social, econômica, cultural e ambiental. No Brasil, as pesquisas envolvendo a busca de novos fármacos proporciona o envolvimento multidisciplinar da pesquisa, bem como o desenvolvimento tecnológico nacional. Apesar deste avanço, muitos biomas brasileiros ainda são pouco explorados como fontes de substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2010; BARREIRO e BOLZANI, 2009). E a enfática necessidade por novos fármacos para o tratamento de doenças, incluindo as infecciosas, aumentou a demanda para descoberta de novas drogas, sendo a utilização de produtos naturais a alternativa mais favorável para tal (CRAGG e NEWMAN, 2013; TAYLOR, 2013; UPADHYAY et al., 2014).

6. CONCLUSÃO

O extrato de própolis vermelha e a resina de umburana apresentaram atividade antimicrobiana e antibiofilme, tanto para o biofilme em formação quanto consolidado dos isolados de staphylococcus coagulase positiva estudados. Porém ainda, são necessários outros estudos para padronização das concentrações e da forma de utilização das referidas substâncias de forma isolada ou em associação com antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. et al., **Mastites em ruminantes no Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2016, 36, 565-573.
- ACOSTA, A.C. et al. **Frequência de genes codificadores de toxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite de tanques expansão comunitários**. Pesquisa Veterinária Brasileira. 37(7):691-696, 2017.
- ADWAN, G. et al. **Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on Pseudomonas aeruginosa**. Turkish Journal of Biology 30: 239–242, 2006.
- AGRA, M. F. et al. **Sinopse da flora Medicinal do Cariri Paraibano**. Oecol. Brasil., 11(3): 323-330. 2007.
- AFOUZAN, H., A. et al. **Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Iranian Propolis**. Iranian Biomedical Journal. 22(1): p. 50-65, 2018.
- AIRES, A. C. P. **Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho**. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária) Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2010. 87p.
- ALENCAR, S. M. et al. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis**. Journal of Ethnopharmacology, Amsterdam-Holanda, v. 113, n 2, p. 278-283, sep. 2007.
- ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. **Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.119-129, 2010.
- ALTIERI, K. T. et al. **Eradication of a Mature Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Biofilm From Acrylic Surfaces**. Brazilian Dental Journal, v.24, n5, p.487-491, 2013.
- AMOS, S. et al. **Neuropharmacological effects of the aqueous extract of Nauclea latifolia root bark in rats and mice**. Journal of Ethnopharmacology 97: 53-57, 2005.
- ANDRADE, S. F. et al. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo: ROCA. 2ª Ed. 2006. 720 p.
- ANDRADE, S.M.O. et al. **Estudo etnoveterinário de plantas medicinais na comunidade Várzea comprida das Oliveiras, Pompal, Paraíba, Brasil**. Rev. Verde de Agroecologia e desenvolvimento sustentável. 2012.
- ANDREWS, J. M. **Determination of minimum inhibitory concentrations**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. v.48, p.5-16, 2001.

- ANTUNES L.C. et al. **Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*;156(Pt 8):2271-82. 2010.**
- ARCHER, N. K. et al. ***Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence* v.2, n.5, p.445-459, 2011.**
- ATIQUÉ, T. S. C. et al. **Sensibilidade à metilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do Centro Universitário de Rio Preto. *Rev. Bras. Farm.* v.93, n.3, p.347-352, 2012.**
- AWANT, A.A. et al. **Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Microbiology*. v. 92, p. 179-1851, 2003.**
- BANDEIRA, F.S. et al. **Frequency of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases, in southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.80, n.1, p.1-6, 2013.**
- BANNERMAN, T.L. ***Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive coccigrow aerobically*. In: MURRAY, P.R et al. (Eds). *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology, p.384-404, 2003.**
- BARBALHO, T.C.F. MOTA, R.A. **Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.2, n.2, 2001.**
- BARDIAU, M. et al. **Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agr-typing. *Veterinary Microbiology*, 185: 1-6, 2016.**
- BARREIRO, E. J. e BOLZANI V. S. **Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.**
- BARRETO, A.L.S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. Universidade Tiradentes, Aracaju, 2008.**
- BARROSO H. et al. ***Microbiologia Médica –Volume 1*. Lidel. ISBN: 978-989-752-057-0, 2014.**
- BIESKI, I.G.C. et al. ***Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil)*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012.**
- BIGNARDI G.E. et al. **Detection of the *mec-a* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *J. Antim Chemother.* 37:53-63. 1996.**
- BISPO JUNIOR, W. et al. **Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.**

BOARI, C. A. et al. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 29(4): 886-895, Out.- Dez. 2009.

BONAMIGO, T. et al. **Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome.** Plos One, California, v.12, n. 9, p. 110-119, Set. 2017.

Bozic, D.D. et al. **Newly-synthesized chalcones-inhibition of adherence and biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Brazilian Journal of Microbiology 45, 1, 263-270, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agronegócio brasileiro. **Regulamento técnico para fixação de Identidade e qualidade de própolis.** Instrução Normativa, nº3. 2001.

BRIDI, R. **International Regulations of Propolis Quality: Required Assays do not Necessarily Reflect their Polyphenolic-Related In Vitro Activities.** Journal of Food Science, Illinois, v. 80, n. 6, p. 1188-1195, jun. 2015.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; ARCURI, E.F. **Como reconhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos.** Circular Técnica n.70. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora MG, Dezembro, 2002.

BRITO, J.R.F; BRITO, M.A.V.P. **Mastite bovina.** São Paulo: Manole, 2000, 114-129p.

BRITO, M.A.V.P; et al. **Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v.51, n.2, p.33-35, abr. 1999.

BUENO, V. F. F. et al. **Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: Frequência e redução na produção.** Ciência Animal Brasileira, v.3, n. 2, p. 47-52, jul./dez. 2002.

BUENO-SILVA, B. et al. **Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis.**Journal of agricultural and food chemistry,Washington-DC, v. 61, n. 19, p. 45-50, mai. 2013.

BUITENHUIS, B.; et al. **In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis.** BioMedCentral Genomics, v.12, 2011.

BUNDGAARD, L. et al. **A selected reaction monitoring-based analysis of acute phase proteins in interstitial fluids from experimental equine wounds healing by secondary intention.** Wound Repair Regen. 24, 525-532, 2016.

CABRAL, I.S.R. et al. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.** Química Nova, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.

- CAIXETA, D. S. **Sanitizantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 2008. 80p.
- CAIXETA, D.S. et al. **Chemical sanitizers to control biofilms formed by two Pseudomonas species on stainless steel surface.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.1, p.142-150, 2012.
- CAMPOS, J.F. et al. **Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee Tetragonisca fiebrigi Jataí.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015.
- CAMPOS, V.C.A. et al. **Micropropagação de umburana de cheiro.** Ciência Rural, 43(4), 2013.
- CANUTO, K.M. **Aspecto do estudo interdisciplinar (Química Agronomia Farmacologia) de Amburana cearensis A.C Smith.** Tese. Universidade Federal do Ceará-UFC. 2007.
- CANUTO, K.M. et al. **Uso de plantas jovens de Amburana cearensis A.C. Smith: Alternativas para Preservação e exploração Econômica e Exploração Econômica da Espécie.** Embrapa; Embrapa semi-árido. P. 24. 2008.
- CANUTO, K.M.; SILVEIRA, E.R. **Estudo fitoquímico de espécimens cultivadas de cumaru (Amburana cearensis A.C. SITH).** Quim. Nova, vol. 33, n.3, 662-666. 2010.
- CARTER G.R. 1988. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária.** Roca, São Paulo. 250p.
- CARVALHO, A.A. et al. **In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis.** Food Chemistry, 126, 1239–1245, 2011.
- CARVALHO, E.M. **Xarope de Cumaru como terapia complementar na Asma persistente leve. Tese de doutorado.** Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal do Ceará (UFC)- Fortaleza. p.180. 2009.
- CHAGAS, L. G. S. et al. **Susceptibilidade e resistência a antimicrobianos de Staphylococcus aureus em condições de biofilme.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. v.52, n.3. p. 228-233. 2015.
- CHUSRI, S; NA PHATTHALUNG, P; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. **Anti-biofilm activity of Quercus infectoria G. Olivier against methicillin-resistant Staphylococcus aureus.** Lett Appl Microbiology, v. 54, p. 511–517, 2012.
- CONCEIÇÃO, G. M. et al. **Plantas medicinais do Cerrado: Comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí.** Scientia plena. Vol. 7, n. 12. 2011.
- CONTRERAS, G.A.; RODRÍGUEZ, J.M. **Mastitis: comparative etiology and epidemiology. J. Mammary Gland Biol.** Neoplasia 16(4):339-356. 2011.
- CORREA, C. P.A. et al. **Avaliação das condições higiênico sanitárias do leite**

cru em pequenas propriedades do município de Bom Sucesso- PR. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. v. 03, n 02, p. 21-28, 2009.

COS, P. et al. **Anti-infective potential of natural products:** How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology. v.106, p.290–302, 2006.

COSER, S. M. et al. **Mastite bovina: controle e prevenção.** In: Boletim Técnico - n. 93, Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG. P. 1-30. 2012.

COSTA, G. M. et al. **Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil.** Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. **A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer:** Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Rev. Virtual Quim. v.2, n.1, p.47-58, 2010.

COSTERTON, J.W. et al. **Bacterial biofilms: a common cause of persistente infections.** Science, 284: 1318-1322, 1999.

CRAGG, G. M. e NEWMAN D. J. **Natural products:** A continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta. v.1830, p.3670–3695, 2013.

DANTAS-SILVA, R. P. etl al. **Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts.** PLOS One, London, v.12, n. 3, p. 1-18, mar. 2017.

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas.** Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP. 2007.

DE BOER, H. J. et al. **Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tan-zania.** Journal of Ethnopharmacology, 96: 461–469, 2005.

DE FUENTE-NÚÑEZ C. et al. **Bacterial biofilm de-velopment as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies.** Curr Open Microbiol; 16 (5): 580–589, 2013.

DHANAWADE, N.B. et al. **Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis.** Veterinary Research Communications 34, 81-89. 2010.

DIAS, R.V.C. **Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina.** Acta Veterinária Brasília, Mossoró, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

DIEDRICH, C. et al. **Detecção de *Staphylococcus aureus* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (pcr), em amostras de leite bovino in natura obtidas de produtores no sul do Brasil.** Alim. Nutr.=Braz. J. Food Nutr., Araraquara, v.24, n.3, p. 291-296. 2013.

- EMBRAPA. **Gado de Leite. Introdução e importância econômica.** 2016.
- EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature.** 2014.
- FALCÃO, S.I. et al. **Phe-nolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis.** *Industrial Crops and Products*, 49, 805–812, 2013.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. **Atividade anti-Staphylococcus aureus de extratos de própolis (EP) de Apis mellifera preparados com diferentes concentrações de etanol como extrator.** *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 24, n.2, p.147–152, 2003.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. **Atividade antimicrobiana de própolis de Apis mellifera obtidas em três regiões do Brasil.** *Ciência Rural*, v.36, n.1, p.294-97, 2006.
- FERNANDES, A.W.C. **Perfil de Susceptibilidade e Influência de Derivados Semissintéticos do Lapachol, extraído da tabebuia avellanadae lor sobre a produção de biofilme em *staphylococcus aureus*.** Universidade Federal do Vale do São Francisco pós-graduação em recursos naturais do semiárido. Petrolina – Pernambuco. 2017.
- FERREIRA, S. B. et al. **β -Lapachona: Sua Importância em Química Medicinal e Modificações Estruturais.** *Rev. Virtual Quim.*, v.2, n.2, p.140-160, 2010.
- FLETCHER M. H. et al. **Draining the moat: disrupting bacterial biofilms with natural products.** *Tetrahedron* v.70, p.6373-6383, 2014.
- FLORA DO BRASIL. **Amburana in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da mastite.** 1 ed. São Paulo: Lemos editorial, 2000. 175p.
- FRANCHI JR. et al. **Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay.** *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2012, 918956-1–918956-6, 2012.
- FRANCHIN, M. **The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti- inflammatory drugs.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 153, n. 5, p. 49-55, jun. 2018.
- FREITAS, A. V. L. et al. **Plantas medicinais: Um estudo etnobotânico nos quintais do Sítio Cruz, São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil.** *Ver. Bras. Bioc.*, Porto Alegre, v.10, n.1, p.48-59. 2011.
- FREITAS, M.F.L. et al. **Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de Staphylococcus coagulase positivos isolados do leite de vacas com mastite no Agreste do estado de Pernambuco.** *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.2, p.171-177, 2005.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V, O. **Análise de Própolis.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.26, n 1, p. 171-178, mar. 2002.

GAO, J. et al. **Han, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in a single herd in China.** Veterinary Journal, v.192, p. 550–552, 2012.

GARCIA, C. A. et al. **Cura de la piel de um equino com terapia com ozono.** Revista CENIC, Ciudad de La Habana, v. 41, 2010, p. 1-6.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. et al. **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study.** The Lancet Infectious Diseases. V 11. I 8. P 595-603. 2011.

GARDANA, C. et al. **Analysis of the poly-phenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 45, 390– 399, 2007.

GILBERT, P. et al. **Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?** J Appl Microbiol. 2002; 92 Suppl: 98S-110S.

GOMES, E.C.S. et al. **Congresso de Pesquisa e Inovação Norte e Nordeste de Educação Tecnológica - João Pessoa-PB. 2007.**

GOMES, F.; HENRIQUES, M. **Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches.** Current Microbiology, New York, v. 72, n. 4, p. 377- 382, 2016.

GONÇALVES, A.L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais.** 209p. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista. 2007.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. **Antibacterial properties of propolis.** Journal of the Royal Society of Medicine, v. 83, p.159-160, 1990.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. **Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis.** Food and Chemical Toxicology, 48, 76–82, 2010.

GUARDABASSI, L; DALSGAARD, A. **Occurrence and fate of antibiotic resistance bacteria in sewage.** Danish Environmental Protection Agency, projecto nº 722, 2002.

GUPTA N, JAIN UK. **Prominent wound healing properties of indigenous medicines.** J Nat Pharmaceuticals. 1: 2–13, 2010.

HAIT J. et al. **Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *S. aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence.** J. Appl. Microbiol. 117:866-875. 2014.

HALL-STOODLEY L, et al. **Bacterial biofilms: from the natural environment to**

infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*; 2 (2): 95–108, 2004.

HAMASAKA, T. et al. **Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan.** *Food Science and Technology Research*, 10, 86–92, 2004.

HENGZHUANG W, WU H, CIOFU O et al. **Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.** *Antimicrob Agents Chemother*; 55 (9): 4469–4474, 2011.

HOIBY N. et al. **Antibiotic resistance of bacterial biofilms.** *Int J Antimicrob Agents*; 35 (4): 322–332, 2010.

HOIBY N. **Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis.** *BMC Med*; 9: 32, 2011.

HUBER, H. et al. **Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons.** *BMC Veterinary Research*, v.7, p.6, 2011.

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçada de extinção.** Portaria nº.37-N de 3 de abril de 1992.

INOUE, H.T. et al. **Produção de própolis por diferentes métodos de coleta.** *Asociación Latinoamericana de Producción Animal*, v.15, n.2, p. 65-69. 2007.

ITO T. **Diretrizes para relatar novos homólogos do gene. mecA .** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 4997–4999.

JAIN, A.; AGARWAL, A. **Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci.** *Journal of Microbiological Methods*, v.76, p.88-92, 2009.

JAYARAMAN, A.; WOOD, T.K. **Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease.** *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2008. 10:145–67.

JUNIOR, R. G. O. et al. **Plantas medicinais utilizadas por um grupo de idosos do Município de Petrolina, Pernambuco.** *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol. IX (3), 16 – 28. 2012.

KALI WAL, B.B.; M. KURJOGI. M.M. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from bovine mastitis.** *Advances in applied science research.* 2(6):229-235. 2011.

KEEFE, G. **Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis.** *Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, n.2, p. 203-216, 2012.

- KHALIL, M. L. **Biological activity of bee propolis in health and disease.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v.7, n.1, p.22-31, 2006.
- KREWER, C.C. **Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil.** *Tropical Animal Health and Production* 47, 511-518. 2015.
- KIRINUS, J. K. et al. **Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região do sul do Brasil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 3, p. 231-238, 2011.
- KONG, K. F. et al. ***Staphylococcus quorum* sensing in biofilm formation and infection.** *International Journal of Medical Microbiology*, v.296, p.133–139, 2006.
- KULKARNI, A.G.; KALIWAL, B.B. **Bovine mastitis: a review.** *International Journal of Recent Scientific Research*. Vol. 4, Issue, 5, pp. 543- 548, May, 2013.
- KUMAZAWA, S. et al. **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins.** *Food Chemistry*, 84, 329–339, 2004.
- KWON, N. et al. **Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness.** *Veterinary Microbiology*, v.117, p.304–312, 2006.
- KWON, N. et al. **Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness.** *Veterinary Microbiology*, v.117, p.304–312, 2006.
- LADEIRA, S.R.L. **Mastite bovina.** In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, A. A.; BORGES, J. R. J. *Doenças dos ruminantes e equinos.* Santa Maria: Palloti, 2007. v.1, p.359-371.
- LANGONI, H. **Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*. V.33, n.5, p.620-626, 2013.
- LANGONI, H. **Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas.** *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, São Paulo, v.3, p.57-64, 2000.
- LANGONI, H. et al. **Considerações sobre o tratamento das mastites.** *Pesq. Vet. Bras.* 37(11):1261-1269, 2017.
- LEAL, L.K.A.M. et al. **Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All.** *Phytomedicine*, 4: 221-227. 1997.
- LEITE E.J. **State-of-knowledge on *Amburana cearensis* (Fr. Allem.) A.C. Smith (Leguminosae: Papilionoideae) for genetic conservation in Brazil.** *Journal for Nature Conservation* 13(1): 49-65. 2005.

- LEWIS, K. **Platforms for antibiotic discovery**. *Nature Rev. Drug Discov.* v. 12, p.371-387, 2013.
- LI, X. et al. **Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin**. *Veterinary Microbiology.* v. 121, p.197–214, 2007.
- LOPES et al. **Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros**. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.79, n.4, p. 477-483. Out/dez 2012.
- LOPES, A.A. **A valiação da atividade antiinflamatória e antioxidantes das cápsulas do estrato seco padronizado e da Afroformosina isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis* A.C SMITH**. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Ceará. 2010.
- LOPES, L. O. et al. **Controle e profilaxia de mastite causada por *Staphylococcus sp.* Em vacas leiteiras: revisão de Literatura**. *Revista Científica de Medicina Veterinária, Garça – SP, Ano XII – Nº 22 – Janeiro de 2014.*
- LÓPEZ, D. et al. **Biofilms**. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* v.2, n7, p1-11, 2010.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa**. São Paulo: Instituto Plantarum. p.298. 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa**. São Paulo: Instituto Plantarum. p.275. 2008.
- LUCETTI, E.C.P. **Efeitos centrais da cumarina (1,2- benzopirona): Estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos**. Dissertação de mestrado da Universidade Federal do Ceará-UFC. 2010.
- LUSTOSA, S. R. et al. **Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia**. *Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba*, v. 18, n. 3, p. 447-454, set. 2008.
- MAGIORAKOS, A.P. et al. **Multidrugresistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for in MAIA, G.N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D e Z computação, 2006. p.104-114.
- MARQUES, J.B. **Comercio e conservação de três espécies vegetais da Caatinga ameaçadas de extinção e de uso medicinal em duas áreas do Cariri Oriental Paraibano**. Dissertação de Mestrado. 2008.
- MARQUES, J.B. et al. **Efeitos do comércio para fins medicinais sobre o manejo e a conservação de três espécies ameaçadas de extinção, em duas áreas do Cariri Oriental Paraibano**. In: GARIGLIO, M.A. et al. *Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga*, p.180-86. Serviço Florestal Brasileiro, Brasília, Brazil. 2010.
- MARTINS, R. P. et al. **Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuibá, MT**. *Ciência Animal Brasileira*. Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-

187, jan./mar. 2010.

MASSEI, R.A. et al. **Mastite** – Diagnóstico, Tratamento e Prevenção: Revisão de Literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v.6, n.10, 2008.

MATHEWS, K.A.; BINNINGTON, A.G. **Wound management using honey**. *Compendium*, v.24, n.1, p.53-60, 2002.

MEDEIROS E.S. et al. **Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina**. *Pesq. Vet. Bras.* 29(1):71-75. 2009.

MEIRA, Q. G. S. **Capacidade de adesão, formação de biofilme e resistência a sanitizantes de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de serviços de alimentação**. Dissertação (PósGraduação em Ciências da Nutrição) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB.110p. 2011.

MELCHIOR, M.B. et al. **Biofilms**: A role in recurrent mastitis infections? Review. *The Veterinary Journal*, Janeiro, 2005.

MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal. Jaboticabal, SP. 122.p. 2008.

MELO, P. C. et al.,. **Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina**. *Bioscience Journal*. Uberlândia, v. 28, n. 1, p. 94-99, Jan./Feb. 2012.

MENDONÇA, C.L. et al. **Etiologia da mastite bovina**. *Veterinária notícias*, v.5, n.1, p.17-118, 1999.

MERINO, N. et al. **Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus***. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 23, p. 832-843, 2009.

MIMICA, M. J. **Atualização sobre detecção laboratorial de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus***. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med.* v.57, p.129-34, 2012.

MONROE, D. **Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms**. *PLoS Biol*, 5(11):2458-2461. 2007.

MORAIS, S.M. et al. **Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará**. *Brasilian Journal of pharmacology.* 15(2): 169-177. 2005.

MORALES, A. B. et al. **Múltiple resistencia antibacterial en aislados de equinos pura sangre de carreras en el hipódromo —La Rinconadall, Caracas, Venezuela**. *Revista de Investigación Veterinária del Perú*, v. 21, n. 2, p. 187- 191, 2010.

MOTA, R. A. et al. **Participação dos *Staphylococcus spp* na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil).** Ci. Anim. Bras., Goiânia, v.13, n.1, p. 124-130, jan./mar. 2012.

MOURA, L.M.D. **Ação antimicrobiana do mel de mandacari e extrato de própolis vermelha e sua associação com terapias alternativas no tratamento de dermatites em equídeos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE. 2019.

NADELL C.D. et al. **The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms.** PLoS Biology 2008; 6(1):171-9.

NETTO, C. A. et al. **Effects of typified propolis on mutants streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial.** Brazilian Dental Science, São José dos Campos, v. 16, n. 2, p. 31- 36, abr. 2013.

NOEL, C. C., et al. **Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Produção de “Slime” de Isolados de *Staphylococcus spp*. Provenientes de casos de Mastite Bovina na Região Sul-Fluminense.** Revista de Saúde. Jan./Jun.; 07 (1): 22-26. 2016.

NOSTRO, A. et al. **Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** J Med Microbiol, 56, 519–523, 2007.

NOVICK, R.P.; GEISINGER, E. **Quorum sensing in staphylococci.** Annu Rev Genet 2008 42:541-64.

NOWACKI, L. et al. **Avaliação dos efeitos analgésicos e antiinflamatório do Extrato bruto de *Amburana cearensis* em camundongos.** Ver. Elet. Biociência, Biotecnologia e Saúde. 2011.

OLIVEIRA, C. M. C. et al. **Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará.** Pesq. Vet. Bras. 31(2):104-110, fevereiro 2011.

OLIVEIRA, F.C.S. et al. **Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido Piauiense.** Rev.Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.3, p.282-301. 2010.

OLIVEIRA, M. R. M. de; MEDEIROS, M. **Agentes causadores de mastite e resistência bacteriana.** Revista Científica de Medicina Veterinária – FACIPLAC. V. 2, n.1, 2015.

OLIVEIRA, N. **Mastite Bovina: Controle e Prevenção.** Boletim Técnico. Boletim Técnico - n.º 93 - p. 1-30, Lavras/MG. 2012.

OMAR, R. M. K. et al. **Chemical characterisation of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*.** Phytochemical Analysis, London, v. 27, n. 2, p. 107- 115, mar. 2016.

OMENA, M.L.A. **Ensaio etnofarmacológico de espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originárias do bioma caatinga.** Saúde e Ambiente em Revista, v.2, n.2, p.92-107. 2007.

OSÉS, S. M. et al. **Bioactive properties of honey with própolis.** Food Chemistry, Amsterdam, v. 196, n. 1, p. 1215-1123, out. 2016.

OTTO, M. **Quorum-sensing control in Staphylococci-a target for antimicrobial drug therapy?** FEMS Microbiol Lett; 241:135-41. 2004.

OTTO, M. **Staphylococcal Biofilms.** Curr Top Microbiol Immunol. v. 322, p.207-228, 2008.

PAHARIK, A. E; HORSWILL A. R. **Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response.** Microbiol Spectr. v.4, n.2, p. 529-566, 2016.

PARK , Y.K. et al. **Antimicrobial activity of propolis on oral micro organisms.** Current Microbiology, v.36, p.24-28, 1998.

PARK J-H et al. **Extracellular protease in Actinomycetes culture supernatants inhibits and detaches Staphylococcus aureus biofilm formation.** Biotechnol Lett, v.34, p.655–661, 2012.

PARK, Y. K. et al. **Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis.** Journal of Agricultural Food Chemistry, São Paulo, v. 50, n 9, p. 2502-2506, mar. 2002.

PATERSON G.K. et al. **O surgimento de Staphylococcus aureus resistente à metilina mecC.** Trends Microbiol . 2014.

PAULINO, R.C. et al. **Conhecimento sobre plantas medicinais entre alunos da Universidade Federal do Semi Árido, Mossoró-RN.** Rev. Verde, v.6, n.4, p.78-90. 2011.

PEIXOTO, R.M.; COSTA, M.M. **Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos antimicrobianos e extratos de plantas/** Rodolfo Moraes Peixoto. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNVASF/PE. 2009.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S. C. **Wining the fight Against Mastitis.** Westfalia Surge Inc. 1880 Country Farm Drive, Naperville, 2000.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C.**Mastitis: Counter Attack.** Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

PICCINELLI, A.L. et al. **Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection electrospray ionization tandem mass spectrometry.** J. Agric. Food Chem. 59, 6484–6491, 2011.

PINTO, M.S. et al. **Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.38, n.6, p.278-83, 2001.

PYORALA S.; TAPONEN S. **Coagulase-negative *staphylococcus*: Emerging mastitis pathogens.** Veterinary Microbiology, v.134, p.3-8, 2009.

QUINN, P.J. et al. trad. Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005. 453-460p.

QUINTAS-JUNIOR, L.J. et al. **Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Simth. Fabaceae; in rodents.** Bras. Journal of pharmacognosy. 19(3):672-676. 2009.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RECIO, M.C.; RÍOS, J.L. **A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988.** Phytotherapy Research, v. 3, p.117-125. 1989.

REGITANO, L.C. A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.180-186.

REGUEIRA, M. S. et al. **Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening.** Food and Chemical Toxicology, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 572-580, mar. 2017.

RIBEIRO, M. E. R. et al. **Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul.** Revista Brasileira de Agrociência, Rio Grande do Sul, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

RIBEIRO, M. E. R. **Ocorrência de mastite causada por *Nocardia* spp. em rebanhos de unidades de produção leiteira no Sul do Rio Grande do Sul.** Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v. 12, n. 4, p.471-473, out-dez, 2006.

RIBEIRO, M.G. et al. **Mastite em animais domésticos,** p.1155-1205. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. Roca, Riode Janeiro. 2016.

RIBEIRO, S. M. et al. **New frontiers for anti-biofilm drug development.** *Pharmacology & Therapeutics*, v.160, p.133–144, 2016.

RIBEIRO, W. O. et al. **Enumeração de microrganismos causadores da mastite bovina e estudo da ação de antimicrobianos.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 69, n. 1, p 45-52, 2014.

RIGHI, A. A. **Comparative Chemistry of Propolis from Eight Brazilian Localities. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v.2, n. 3, p. 50-64, mar. 2013.

RIGHI, A.A. et al. **Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities**. J. Sci. Food Agric. 91, 2363–2370, 2011.

RISTIVOJEVIC, P. **Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics**. Plos One, London, v. 11, n. 6, set. 2016.

ROQUE, A.A. et al. **Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil)**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.1, p.31-42. 2010.

SA, J.P.N et al. **Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite**. Revista Brasileira de Gestão Ambiental (Pombal - PB - Brasil) v. 12, n.1, p.01- 13, 2018.

SADEK, K. et al. **Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis**. Trop. Anim. Health Prod., v.49, p.431-437, 2017.

SAEKI, E. K., et al. **Mastite bovina por *staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis**. Acta Veterinaria Brasilica, v.5, n.3, p.284-290, 2011.

SALIMENA, A. P.S. et al. **Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected Brazilian dairy farms**. Veterinary Research Community, v.40, p.97-106, 2016.

SALIMENA, A.P.S.A. **Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina**. CES REVISTA, Juiz de Fora, v. 28, n. 1. p. 88-102. 2014.

SALTA, M. et al. **Anti-biofilm performance of three natural products against initial bacterial attachment**. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, p. 21757-21780, 2013.

SANTANA, E.H.W. et al. ***Estaphylococcus* em Alimentos**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS, L.L. et al. **Perfil etiológico da mastite bovina na bacia de Santa Isabel do Oeste, Paraná**. Ciência Animal Brasileira, v.11, n.4, p.860-866, 2010.

SANTOS, M. V.; TOMAZI, T. **Mastite contagiosa ou ambiental: Um diagnóstico em nível de rebanho**. Revista Leite Integral, Piracicaba, SP, p. 30 - 34, 01 out. 2012.

SANTOS, M. V; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle de mastites e melhoria da qualidade do leite.** Manole, Barueri/SP. p. 47-64. 2007.

SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de Biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite.** 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista– Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal. Jaboticabal, SP. 2009.

SAWAYA, A.C.H.F et al. **Composition and antioxidant activity of propolis from three species of Scaptotrigona stingless bees.** Journal of ApiProduct and ApiMedical Science, 1, 37–42, 2009.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. **Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Tests.** Journal of the American Veterinary Medical Association, v.130, p.199-204, 1957.

SCHWARZ, S. et al. **Plasmid-mediated antimicrobial resistance in staphylococci and other firmic-utes.** Microbiol. Spectr. 2, 2014.

SEIDEL, V. et al. **Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones.** Phyto-therapy Research, 22, 1256–1263, 2008.

SFORCIN, J. M. et al. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** Journal of Ethnopharmacology, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 243-249, fev. 2000.

SHOUSHA, A. et al. **Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes.** Applied and Environmental Microbiology, v. 81, n. 14, p. 4600–4606, 2015.

SILVA, A. T. F; MOTA, R. A. **Mastite: perguntas e respostas-** 1. ed. - Recife: EDUFRPE, 2019. 58p.

SILVA, D.M. **Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina.** 2016. 89p. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SILVA, R. A.et al. **Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba,** Ciência Rural, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1842-1848, dez. 2006.

SILVA, S.L.C. et al. **Plantas medicinais usadas pela comunidade do povoado de Laços (Tanhaçu/BAHIA) e encontradas na floresta nacional contendas do Sincora. Ver. Caatinga, v.25, n.3, p. 130-136. 2012.**

SIMOJOKI, H., et al 2012. **Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection.** Vet Microbiol. 2012 Aug 17;158(3-4):344-52.

- SIQUEIRA, A.B. et al. **Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil**. Lett. Appl. Microbiol. 48, 90–96, 2009.
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. **Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil**. Acta bot. bras. 20(1). 135-142 p. 2006.
- SOUZA, D.E. et al. **An experimental model to study the effects of a senna extract on the blood constituent labeling and biodistribution of a radiopharmaceutical in rats**. CLINICS 66(3):483-486. 2011.
- STAMFORD, T. L. M. et al. **Enterotoxigenicidade de staphylococcus spp. isolados de leite in natura**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(1): 41-45, jan.-mar. 2006.
- STENVANG, M. et al. **Epigallocatechin Gallate Remodels Overexpressed Functional Amyloids in Pseudomonas aeruginosa and Increases Biofilm Susceptibility to Antibiotic Treatment**. Journal of Biological Chemistry, v. 291, n. 51, p. 26540–26553, 2016.
- STEPANOVIC S., et al. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microb Meth** 40(2):175–179.
- STOODLEY, P., et al. **Biofilms as complex differentiated communities**. Annu Rev Microbiol, 56:187-209. 2002.
- SZWEDA, P. et al. **Antibiotic resistance in staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in Eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: Lysostaphin, Nisin and Polymyxin B**. J. Vet. Med. Sci. v.76(3), p.355-362,2014.
- TAYLOR, P. W. **Alternative natural sources for a new generation of antibacterial**. International Journal of Antibacterial Agents. v.42, p.195-201, 2013.
- TIWARI, M. K. **Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast Yarrowia lipolytica**. Bioresource technology, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 636-646, nov. 2012.
- TREMBLAY, Y. D. et al. **Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms**. Journal of Dairy Science. v.96, n. 1, p. 234-246, 2013.
- TRETIN, 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.
- TSUBAKISHITA, S. **Staphylococcal cassette cromossome mec-like element in Macrocooccus caseolyticus**. Antimicrob. Agents Chemother. 2010; 54: 1469–1475. 2010.
- UPADHYAY, A. et al. **Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis**. BioMed

Research International. 2014.

VARGAS, A.C. et al. **Antimicrobial activity of coating biome ethanolic plant extract against gram negative and positive bacteria.** R. Bras. Ci. Vet., v.18, n. 2/3, p. 62-66. 2011.

VASUDEVAN, P. et al. **Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation.** Veterinary n.1, p. 73-81, 2009.

VASUDEVAN, P. et al. **Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation.** Veterinary Microbiology. v. 92, p. 179-1851, 2003.

VERMELHO A.B. et al. **Bacteriologia geral.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.541-560. 2007.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. et al. **Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer.** Frontiers in Microbiology, v. 7, n. FEB, p.1–10, 2016.

WEESE, J.S. et al. **Orientações para uso de antimicrobianos em equinos.** In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. Guia de antimicrobianos em Veterinária. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 10, p. 201-222.

WENDLANDT, S. et al. **The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin.** Int. J. Med. Microbiol. 303, 338–349, 2013.

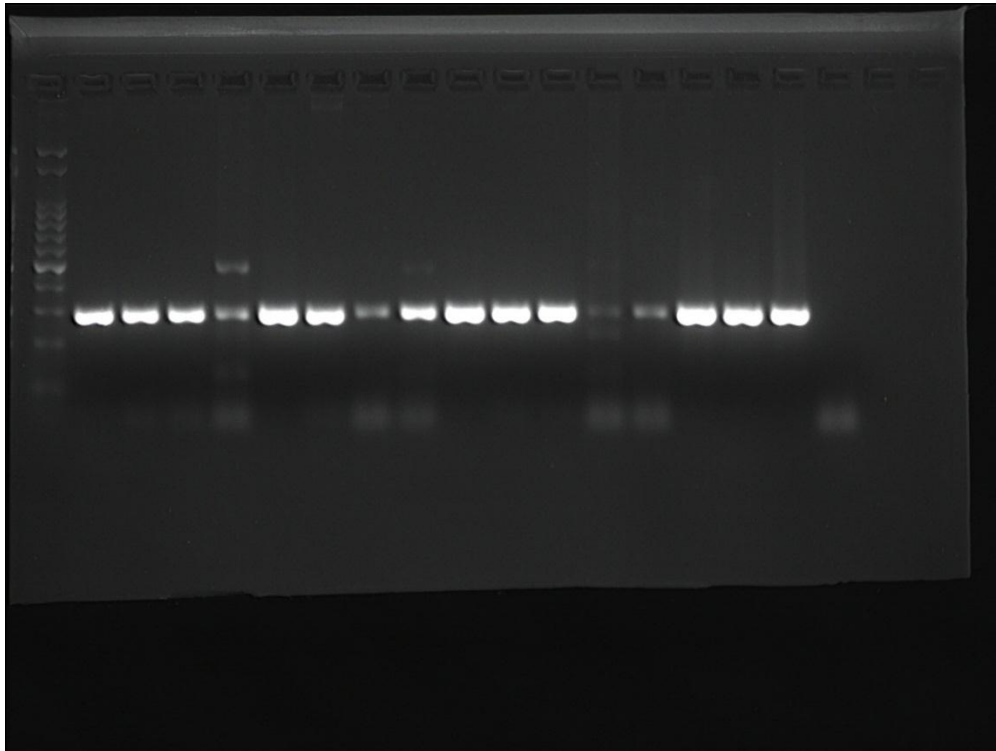
WHIST, A.C.; OSTERAS, O.; SOLVEROD, L. 2009. **Association between isolation of Staphylococcus aureus one week after calving and milk yield, somatic cell count, clinical mastitis, and culling through the remaining lactation.** Journal of Dairy Research. Cambridge, v.76, p. 24-35.

WOLCOTT, R.D. et al. **Chronic wounds and the medical biofilm paradigm.** J Wound Care, 19:45, 2010.

ZAFALON, L.F., et al. **Boas práticas de ordenha.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008.

APÊNDICE A – Protocolo para realização da reação em cadeia de polimerase para identificação dos genes *nuc*, *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *icaA* e *icaD* em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva causadores de mastite subclínica em vacas na região das Bacias leiteiras de Alagoas e Pernambuco, 2019.

Gene *nuc*



Ordem de Aplicação no Gel:

1. Ladder Ludwig 100 pb: Bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2500.
2. Amostra 166
3. Amostra 15
4. Amostra 13
5. Amostra 179
6. Amostra 103
7. Amostra 20
8. Amostra 07
9. Amostra 190
10. Amostra 25
11. Amostra 105
12. Amostra 23
13. Amostra 170
14. Amostra 185
15. Amostra 29
16. Amostra 99
17. Controle positivo

18. Controle negativo

Condições da Reação:

Sequência (5'-3')		Tamanho do Fragmento
Primer: F	GAG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	279 pb
Primer: R	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	

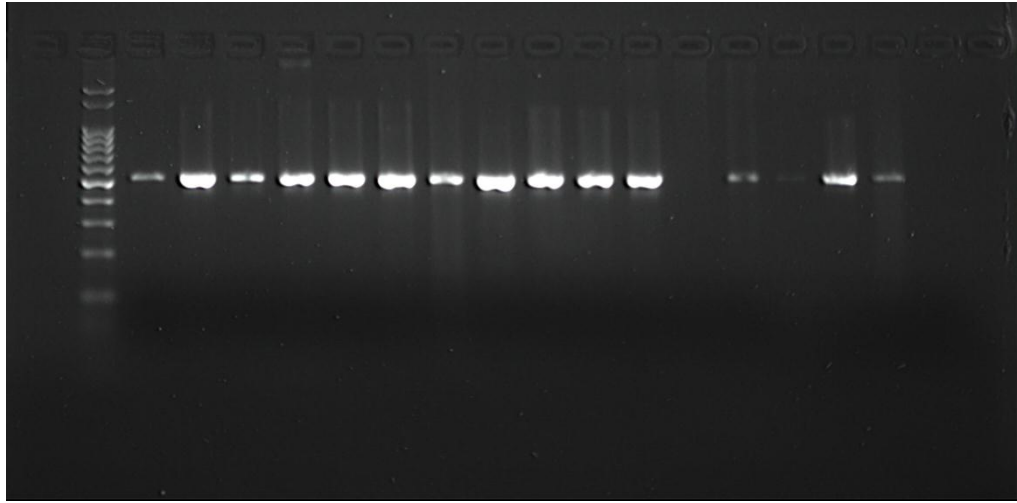
Condições da Reação	
Reagentes	Concentração Final
H ₂ O	-
Tampão	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,4 mM
Primer F	0,6 µM
Primer R	0,6 µM
Taq DNA Polimerase	0,1 U

DNA	Volume
Por reação com volume final de 15 µL	4 µL

Condições do Termociclador					
Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Quantidade de Ciclos
94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	37
5 min	1 min	30 s	1 min	7 min	

Controle Positivo	
Amostra	Responsável
ATCC 25923 - <i>S. aureus</i>	Amostra 24 (Renata)

Gene BlaZ



Ordem de Aplicação no Gel:

19. Ladder Ludwig 100 pb: Bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2500.
20. Amostra 07
21. Amostra 13
22. Amostra 15
23. Amostra 20
24. Amostra 23
25. Amostra 25
26. Amostra 29
27. Amostra 99
28. Amostra 103
29. Amostra 105
30. Amostra 166
31. Amostra 170
32. Amostra 179
33. Amostra 185
34. Amostra 190
35. Controle positivo
36. Controle negativo

Condições da Reação:

Sequência (5'-3')		Tamanho do Fragmento
Primer:	AAG AGA TTT GCC TAT GCT TC	517 pb
Primer:	GCT TGA CCA CTT TTA TCA GC	

Condições da Reação	
Reagentes	Concentração Final
H ₂ O	-
Tampão	1X
MgCl ₂	3,3 mM

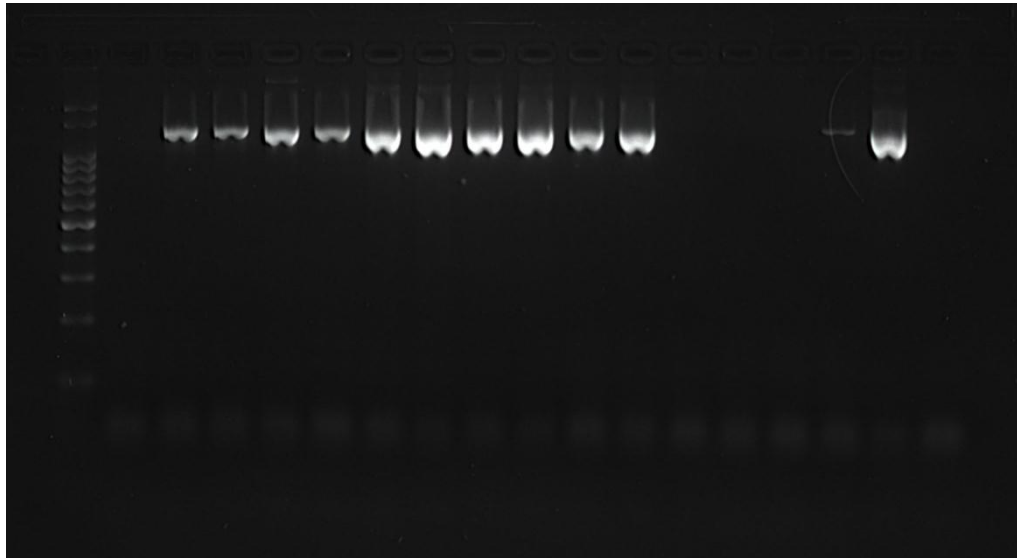
dNTP	0,4 mM
Primer F	0,4 μ M
Primer R	0,4 μ M
Taq DNA Polimerase	0,1 U

DNA	Volume
Por reação com volume final de 15 μ L	4 μ L

Condições do Termociclador					
Desnaturaçã Inicial	Desnaturaçã o	Anelamento	Extensã o	Extensã o Final	Quantidade de Ciclos
94°C	94°C	50,5°C	72°C	72°C	30
4 min	1 min	30 s	30 s	5 min	

Controle Positivo	
Amostra	Responsável
ATCC 33591	<i>S. aureus</i> – Amostra 24 (Renata)

Gene IcaA



Ordem de Aplicação no Gel:

1. Ladder Ludwig 100 pb: Bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2500.
2. Amostra 07
3. Amostra 13
4. Amostra 15
5. Amostra 20
6. Amostra 23
7. Amostra 25
8. Amostra 29
9. Amostra 99

10. Amostra 103
11. Amostra 105
12. Amostra 166
13. Amostra 170
14. Amostra 179
15. Amostra 185
16. Amostra 190
17. Controle positivo
18. Controle negativo

Condições da Reação:

Sequência (5'-3')		Tamanho do Fragmento
Primer: F	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G	1315pb
Primer: R	AAG ATA ATG CGA TAA GTG C	

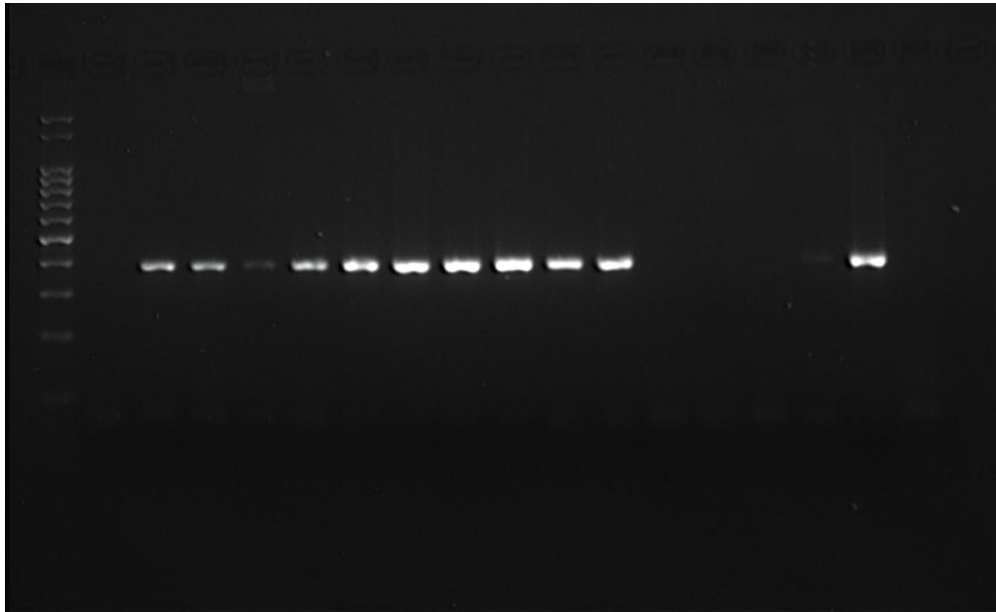
Condições da Reação	
Reagentes	Concentração Final
H ₂ O	-
Tampão	1X
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP	0,28 mM
Primer F	1 µM
Primer R	1 µM
Taq DNA Polimerase	0,1U

DNA	Volume
Para reação com volume final de 25 µL	5 µL

Condições do Termociclador					
Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Quantidade de Ciclos
	94°C	49°C	72°C	72°C	30
	45 s	15 s	60 s	7 min	

Controle Positivo	
Amostra	Responsável
ATCC 12600 – <i>S. aureus</i>	Amostra 77MD (Rodolfo)

Gene IcaD



Ordem de Aplicação no Gel:

1. Ladder Ludwig 100 pb: Bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2500.
2. Amostra 07
3. Amostra 13
4. Amostra 15
5. Amostra 20
6. Amostra 23
7. Amostra 25
8. Amostra 29
9. Amostra 99
10. Amostra 103
11. Amostra 105
12. Amostra 166
13. Amostra 170
14. Amostra 179
15. Amostra 185
16. Amostra 190
17. Controle positivo
18. Controle negativo

Condições da Reação:

Sequência (5'-3')		Tamanho do Fragmento
Primer: F	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	230pb
Primer: R	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	

Condições da Reação	
Reagentes	Concentração Final

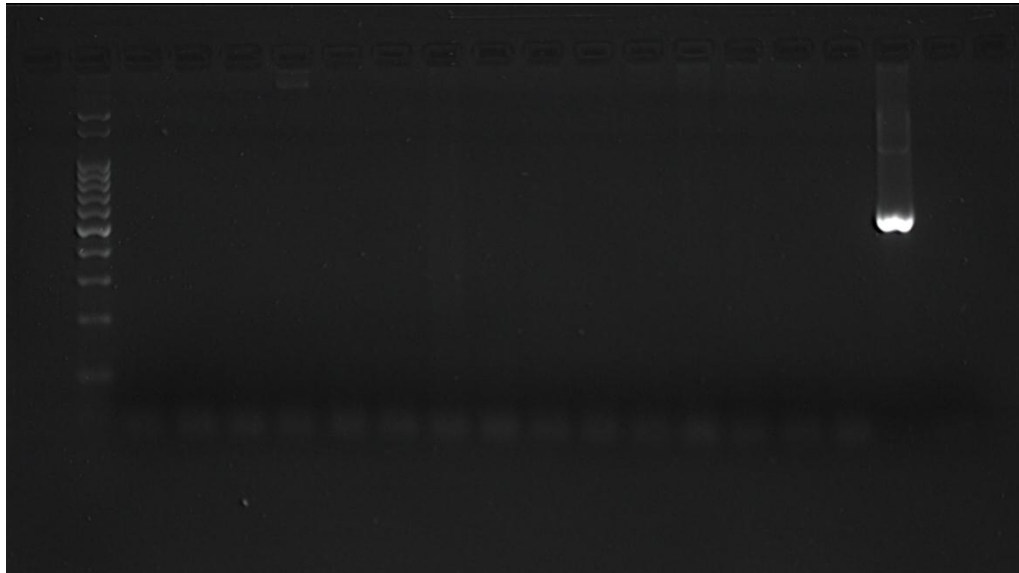
H₂O	-
Tampão	1X
MgCl₂	1,33 mM
dNTP	0,2m μ M
Primer F	1 μ M
Primer R	1 μ M
Taq DNA Polimerase	0,1U

DNA	Volume
Para reação com volume final de 15 μ L	2 μ L

Condições do Termociclador					
Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Quantidade de Ciclos
94°C	94°C	49,8°C	72°C	72°C	30
2 min	45 s	45 s	60 s	7 min	

Controle Positivo	
Amostra	Responsável
ATCC 12600- <i>S. aureus</i>	Amostras 61, 62 e 63 (Renata)

Gene MecA



Ordem de Aplicação no Gel:

1. Ladder Ludwig 100 pb: Bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2500.
2. Amostra 07
3. Amostra 13
4. Amostra 15

5. Amostra 20
6. Amostra 23
7. Amostra 25
8. Amostra 29
9. Amostra 99
10. Amostra 103
11. Amostra 105
12. Amostra 166
13. Amostra 170
14. Amostra 179
15. Amostra 185
16. Amostra 190
17. Controle positivo
18. Controle negativo

Condições da Reação:

Sequência (5'-3')		Tamanho do Fragmento
Primer: F	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	533pb
Primer: R	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	

Condições da Reação	
Reagentes	Concentração Final
H₂O	-
Tampão	1X
MgCl₂	3,3 mM
dNTP	0,4 mM
Primer F	0,4 µM
Primer R	0,4 µM
Taq DNA Polimerase	0,1U

DNA	Volume
Para reação com volume final de 15 µL	4 µL

Condições do Termociclador					
Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Quantidade de Ciclos
94°C	94 °C	68°C	72°C	72°C	15
60 s	30 s	30 s	30 s	30 s	

Condições do Termociclador					
Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Quantidade de Ciclos
-	94 °C	60°C	72°C	72°C	20
-	30 s	30 s	30 s	2 min	

Controle Positivo

Amostra	Responsável
ATCC 33591 – <i>S. aureus</i>	-

Gene MecC



Ordem de Aplicação no Gel:

1. Ladder Ludwig 100 pb: Bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2500.
2. Amostra 07
3. Amostra 13
4. Amostra 15
5. Amostra 20
6. Amostra 23
7. Amostra 25
8. Amostra 29
9. Amostra 99
10. Amostra 103
11. Amostra 105
12. Amostra 166
13. Amostra 170
14. Amostra 179
15. Amostra 185
16. Amostra 190
17. Controle positivo
18. Controle negativo

Condições da Reação:

Sequência (5'-3')		Tamanho do Fragmento
Primer F	TCA CCA GGT TCA ACY CAA AA	355pb
Primer R	CCT GAA TCW GCT AAT AAT A	

Condições da Reação	
Reagentes	Concentração Final
H₂O	-
Tampão	1X
MgCl₂	1,75 mM
dNTP	0,3 µM
Primer F	0,3 µM
Primer R	0,3 µM
Taq DNA Polimerase	2U

DNA	Volume
Para reação com volume final de 25µL	2 µL

Condições do Termociclador					
Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final	Quantidade de Ciclos
95°C	95°C	48,6°C	72°C	72°C	35
10 min	45 s	45 s	45 s	10 min	

Controle Positivo	
Amostra	Responsável
MEC-C 1	Flávia