

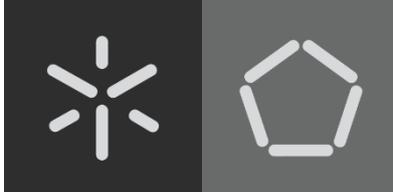


Ana Raquel Costa Almeida

**Atividade Antimicrobiana do Ácido
Rosmarínico e Extratos de Plantas no
Combate à Mastite Bovina**

Universidade do Minho
Escola de Engenharia





Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Ana Raquel Costa Almeida

**Atividade Antimicrobiana do Ácido Rosmarínico e
Extratos de Plantas no combate à Mastite Bovina**

Dissertação de Mestrado
Biotecnologia

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Fernanda Gomes
Professora Doutora Mariana Henriques

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa quero agradecer às pessoas que de alguma forma tornaram este trabalho possível, desde já, obrigada a todos.

Quero começar por agradecer à Universidade do Minho, ao Centro de Engenharia Biológica e à Professora Doutora Joana Azeredo por terem possibilitado a execução deste trabalho.

À Doutora Fernanda Gomes, pela orientação, pelo tempo despendido e paciência no esclarecimento de dúvidas, mas também por todos os conhecimentos que transmitiu. Agradeço também à Professora Doutora Mariana Henriques que juntamente com a Doutora Fernanda Gomes foi dando indicações e motivação para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pelo apoio e companheirismo que transmitiram.

À Beatriz pela amizade, pelo apoio e motivação para a continuação deste trabalho.

Ao meu pai, à minha mãe e irmã pelo apoio e motivação na vinda para Braga.

Ao meu namorado pelo apoio incondicional, pela compreensão e constante motivação. Sem ele nada disto seria possível.

Declaração de integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Atividade Antimicrobiana do Ácido Rosmarínico e Extratos de Plantas no combate à Mastite Bovina

Resumo

A mastite bovina é uma das doenças infecciosas mais prevalentes, com perdas económicas consideráveis para a indústria de laticínios em todo o mundo. Apesar dos antibióticos serem a terapia mais usada atualmente, o seu uso indiscriminado tem sido amplamente associado ao surgimento de espécies resistentes dificultando o tratamento desta patologia. Para além disso, alguns microrganismos patogénicos têm a capacidade de formar biofilmes, dificultando ainda mais o controlo da mastite bovina. O interesse em compostos bioativos de plantas e o uso dos próprios extratos de plantas (EPs) está a ganhar cada vez mais importância, destacando a sua potencial aplicabilidade no desenvolvimento de novas formulações com propriedades antimicrobianas. No sentido de testar a potencialidade destes agentes naturais na resolução deste problema, este trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial do ácido rosmarínico (AR), bem como alguns EPs e a combinação de ambos como agentes bioativos e como potencial alternativa aos antimicrobianos habitualmente utilizados no controlo da mastite bovina e na gestão da indústria de laticínios.

Para tal, foram feitos testes de suscetibilidade, nomeadamente, difusão em disco e microdiluição. Além disso foi também estudado o efeito do AR em biofilmes. Com o método da difusão em disco verificou-se que o AR não inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922. O valor da concentração mínima inibitória (CMI) obtido para *S. aureus* ATCC 25923 foi de 3,13 mg/mL, enquanto em biofilmes, com uma concentração de 6,25 mg/mL, verificou-se apenas uma ligeira redução na viabilidade celular quer na formação inicial do biofilme quer em biofilmes pré-formados. Foram também testados alguns EPs, nomeadamente, *Glycyrrhiza glabra* L., *Erica australis*, *Prunella vulgaris* e *Chamaespartium tridentatum*. O extrato hidroetanólico (HE) de *E. australis* e os extratos hidrometanólico (HM) e HE de *G. glabra* L. foram os que demonstraram melhores resultados, tendo-se obtido zonas de inibição de 15-16 mm. No entanto, foi nos extratos de *G. glabra* L. que foi obtida uma CMI de menor valor (0,098-0,19 mg/mL). O efeito combinado do AR com o extrato HE de *G. glabra* L. foi também testado, obtendo-se um efeito sinérgico na combinação de $\frac{1}{4}$ CMI de AR e $\frac{1}{2}$ CMI do extrato HE de *G. glabra* L..

O uso do AR e extrato HE de *G. glabra* L. em combinação demonstrou que estes dois agentes antimicrobianos podem ser importantes no combate à mastite bovina e serem usados no desenvolvimento de novas formulações com propriedades antimicrobianas.

Palavras-chave: ácido rosmarínico; extratos de plantas; mastite bovina; *S. aureus*

Antimicrobial Activity of Rosmarinic Acid and Plant Extracts against Bovine Mastitis

Abstract

Bovine mastitis is one of the most prevalent infectious diseases, with considerable economic losses for the dairy industry worldwide. Although antibiotics are the most widely used therapy today, their indiscriminate use has been largely associated with the emergence of resistant species making it difficult to treat this condition. In addition, some pathogenic microorganisms have the ability to form biofilms, further complicating the control of bovine mastitis. Interest in bioactive plant compounds and the use of plant extracts (PE) themselves is becoming increasingly important, highlighting their potential applicability in the development of new formulations with antimicrobial properties. In order to test the potential of these natural agents in solving this problem, this work aimed to evaluate the potential of rosmarinic acid (RA), as well as some PE and the combination of both as bioactive agents and as a potential alternative to commonly used antimicrobials in the control of bovine mastitis and the management of the dairy industry.

For this, susceptibility tests were made, namely disk diffusion and microdilution. In addition, the effect of RA on biofilms was also studied. With the disk diffusion method it was found that the RA did not inhibit the growth of *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922. The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for *S. aureus* ATCC 25923 was 3,13 mg/mL, while in biofilms, with a concentration of 6.25 mg/mL, there was only a slight reduction in cell viability in both initial biofilm formation and preformed biofilms. Some PE were also tested, namely *Glycyrrhiza glabra* L., *Erica australis*, *Prunella vulgaris* and *Chamaespartium tridentatum*. *E. australis* hydroethanolic extract (HE) and *G. glabra* L. hydromethanolic extract (HM) and HE showed the best results, with inhibition zones of 15-16 mm being obtained. However, it was in the extracts of *G. glabra* L. where a lower MIC value (0.098-0.19 mg / mL) was obtained. The combined effect of RA with *G. glabra* L. HE extract was also tested and a synergistic effect was obtained by combining $\frac{1}{4}$ CMI of AR and $\frac{1}{2}$ CMI of *G. glabra* L. HE extract.

The use of RA and *G. glabra* L. HE extract in combination demonstrated that these two antimicrobial agents may be important in combating bovine mastitis and be used in the development of new formulations with antimicrobial properties.

Keywords: rosmarinic acid; plant extracts; bovine mastitis; *S. aureus*

Índice

Capítulo 1 - Introdução	12
1.1. Mastite bovina.....	12
1.2. Agentes etiológicos.....	12
1.3. Biofilmes.....	13
1.4. Terapias usadas.....	15
1.5. Terapias alternativas.....	16
1.5.1. Vacinas.....	16
1.5.2. Probióticos.....	17
1.5.3. Anticorpos IgY.....	17
1.5.4. Fagos.....	18
1.5.5. Inibidores de <i>quorum sensing</i>	18
1.5.6. Nanopartículas.....	19
1.5.7. Bacteriocinas.....	19
1.5.8. Péptidos antimicrobianos.....	19
1.5.9. Fitocompostos.....	20
1.5.10. Ácido Rosmarínico.....	22
1.6. Objetivos.....	23
Capítulo 2 – Materiais e métodos	23
2.1. Meios de cultura e condições de crescimento.....	23
2.2. Preparação da solução de ácido rosmarínico.....	24
2.3. Preparação dos extratos de plantas.....	24
2.4. Determinação da atividade antimicrobiana em células planctónicas.....	24
2.4.1. Efeito dos solventes na atividade antimicrobiana.....	24
2.4.2. Difusão em disco.....	24
2.4.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	25
2.5. Determinação da atividade antimicrobiana em biofilmes.....	25
2.5.1. Na formação inicial do biofilme.....	25
2.5.2. Em biofilmes pré-formados.....	25
2.6. Avaliação sinérgica do ácido rosmarínico e do extrato hidroetanólico de alcaçuz.....	26
2.6.1. Método de checkerboard.....	26
2.6.2. Determinação dos índices de concentração inibitória fracionária ("FICI").....	26
2.7. Análise estatística.....	27
Capítulo 3 – Resultados e discussão	27
3.1. Atividade antimicrobiana do ácido rosmarínico.....	27
3.1.1. Efeito dos solventes usados na preparação das soluções stock.....	27

3.1.2.	Células planctónicas.....	28
3.1.3.	Formação inicial do biofilme.....	29
3.1.4.	Biofilmes pré-formados.....	30
3.2.	Atividade antimicrobiana de extratos de plantas.....	31
3.3.	Avaliação sinérgica do ácido rosmarínico e extrato hidroetanólico de alcaçuz.....	33
Capítulo IV – Considerações finais.....		35
Referências bibliográficas.....		36

Abreviaturas e siglas

ANOVA - *Analysis Of Variance*

AR - Ácido Rosmarínico

ATCC – *American Type Culture Collection*

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMI - Concentração Mínima Inibitória

DO - Densidade Ótica

EPs – Extratos de plantas

FICI - *Fractional Inhibitory Concentration Index*

FIC - *Fractional Inhibitory Concentration*

MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*

NPs - Nanopartículas

TSA – *Tryptic soy agar*

TSB – *Tryptic soy broth*

UFCs - Unidades Formadoras de Colónias

Índice de figuras

Figura 1. Representação esquemática da formação de biofilmes. Adaptado de: Phillips et al. (2010).	14
Figura 2. Atividade antimicrobiana do etanol e metanol em <i>S. aureus</i> .	27
Figura 3. Unidades formadoras de colónias (UFC) de células planctónicas de <i>S. aureus</i> expostas a diferentes concentrações de AR (mg/mL) e metanol (% v/v). As barras representam a média e o erro o desvio-padrão de pelo menos três experiências independentes. Foram analisadas diferenças estatísticas utilizando o teste ANOVA (fator único), com * a representar diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).	29
Figura 4. Atividade antimicrobiana do AR (mg/mL) e metanol (% v/v) testada a diferentes concentrações na formação inicial do biofilme de <i>S. aureus</i> . As barras representam a média e o erro o desvio-padrão de pelo menos três ensaios independentes.	30
Figura 5. Atividade antimicrobiana do AR (mg/mL) e metanol (% v/v) em biofilmes pré-formados de <i>S. aureus</i> . As barras representam a média e o erro o desvio-padrão de pelo menos três experiências independentes.	31
Figura 6. Unidades formadoras de colónias (UFC) de <i>S. aureus</i> incubadas com concentrações acima e abaixo da CMI de diferentes extratos de plantas. AlDec: decocção de alcaçuz; AlMe: extrato HM de alcaçuz; AlEt: extrato HE de alcaçuz; AlInf: infusão de alcaçuz.	33
Figura 7. Representação esquemática dos resultados obtidos pelo método de checkerboard e respetivos FICI.	34

Índice de tabelas

Tabela 1. Exemplos de extratos de plantas testados em microrganismos isolados de mastite bovina..	20
Tabela 2. Atividade antibacteriana de diferentes extratos de plantas em <i>S. aureus</i> ATCC 25923.	32
Tabela 3. Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de plantas testados em <i>S. aureus</i> , determinada pelo método de microdiluição em meio TSB.	33

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Mastite bovina

A mastite bovina é uma doença veterinária que causa inflamação na glândula mamária e uma das patologias bovinas mais devastadoras em termos de perdas económicas para a indústria dos laticínios a nível mundial [1].

Dependendo da sintomatologia, a mastite bovina pode ser classificada em subclínica (difícil de ser detetada, devido à ausência de sintomas visíveis), clínica (sintomas visíveis) e crónica (inflamação persistente). O seu grau de severidade depende da natureza do microrganismo patogénico causador da doença e da idade, raça, saúde imunológica e estado de lactação do animal [2].

A nível económico, tem como consequências principais a diminuição da produção e qualidade do leite, o abate prematuro, custos associados aos tratamentos veterinários, entre outros [3]. No sentido de evitar estas consequências é necessário haver uma prevenção por parte da indústria dos laticínios, nomeadamente, boas práticas higiénicas; boas práticas pecuárias; evitar lesões na glândula mamária (mesmo ocorrendo, o tratamento deve ser rápido); uso de antissépticos antes e depois de ordenhar; rastreio regular do leite (reduz o número de animais infetados), entre outros [4].

O controlo e prevenção desta doença continua a ser um desafio principalmente devido ao envolvimento de diversos agentes etiológicos [5].

1.2. Agentes etiológicos

Existem diversos agentes etiológicos associados à mastite bovina, entre os quais, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* [6], *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis* e *Klebsiella* spp. *Staphylococcus* spp são os microrganismos mais isolados, sendo *Staphylococcus aureus* a espécie com maior prevalência [7], [8].

Dependendo do microrganismo causador da doença, esta pode ser categorizada epidemiologicamente em mastite contagiosa e ambiental. Na mastite contagiosa, os microrganismos patogénicos têm como principal reservatório as glândulas mamárias de vacas infetadas. Como o próprio nome indica, há transferência destes para outras vacas principalmente durante a ordenha e tendem a resultar em infeções subclínicas crónicas com surtos de episódios clínicos [9]. Os microrganismos patogénicos contagiosos incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp. e

Corynebacterium bovis. Por sua vez, na mastite ambiental, o reservatório primário é o ambiente em que a vaca vive. Os patogênicos ambientais compreendem a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, resultando em infecções majoritariamente clínicas e de curta duração [10], [11].

Os estafilococos coagulase-negativos (CNS, do inglês *coagulase-negative staphylococci*) são um grupo de microrganismos menos frequentemente isolados em comparação com *S. aureus*, mas dados recentes mostram o aumento da significância destas bactérias como agentes causadores de mastites bovinas [12], [13]. Dentro deste grupo, *S. chromogenes* é um dos mais prevalentes [14].

Apesar da baixa prevalência da infecção por estafilococos resistentes à metilina (MRS, do inglês *methicillin-resistant staphylococci*), existem alguns casos de mastite bovina provocados por este grupo de microrganismos [15]–[17]. Estas espécies bacterianas são uma preocupação de saúde pública, e a caracterização da sua resistência antimicrobiana e perfil de virulência é importante para controlar melhor a sua disseminação [18], [19]. De acordo com Seixas *et al.* (2014), os perfis de resistência antimicrobiana mais comuns foram a resistência a antibióticos. Este estudo também confirma que apesar da baixa prevalência de MRS, estes expressam frequentemente outros traços de virulência, especialmente capacidade de formação de biofilmes, que podem representar sérios problemas [18].

1.3. Biofilmes

Os biofilmes, resultantes de adesão celular, são comunidades estruturadas de células microbianas envolvidas numa matriz exopolissacarídica autoproduzida e aderidas quer a superfícies inertes quer a vivas. O estabelecimento de um biofilme é o prelúdio para o desenvolvimento de várias infecções crônicas intratáveis. Apesar dos vários esforços, o tratamento de uma infecção após o estabelecimento do biofilme é frequentemente em vão devido à reduzida suscetibilidade do biofilme aos antibióticos. Pelo menos três mecanismos foram propostos para explicar a resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos nomeadamente falha do antimicrobiano em penetrar no biofilme, crescimento lento e resposta ao stresse, e indução de um fenótipo de biofilme [20].

A capacidade de formação de biofilmes evidenciada por algumas espécies, dificulta o controlo desta patologia. Os agentes etiológicos mais comuns, nomeadamente os géneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *E. coli* são bactérias que apresentam capacidade de formação de biofilmes [13], [21], [22].

Um biofilme é caracterizado pela adesão de microrganismos a uma superfície, seguida da divisão celular em condições adequadas de crescimento (nutrientes e temperatura), resultando na colonização da superfície [23]. A formação de biofilmes é considerada um mecanismo de proteção [23], [24], ou seja, microrganismos que crescem deste modo são mais resistentes a antimicrobianos que as bactérias não aderidas [24], [25]. Mais especificamente, a formação de biofilmes representa um problema grave para a indústria dos laticínios uma vez que bactérias incorporadas na sua própria matriz podem sobreviver aos habituais processos de limpeza e higiene [19].

O processo de formação do biofilme ocorre em duas fases: uma fixação superficial inicial das células bacterianas e uma fase de maturação caracterizada pela multiplicação microbiana (Figura 1). A adesão inicial à superfície é tipicamente mediada por ácido teicóico e exoproteínas, consistindo de componentes superficiais microbianos que reconhecem moléculas de matriz adesiva e da proteína associada a biofilme (*Bap*, do inglês *biofilm-associated protein*). A fase de maturação do biofilme é caracterizada por uma proliferação bacteriana multicamadas envolvida numa matriz autoproduzida [26].

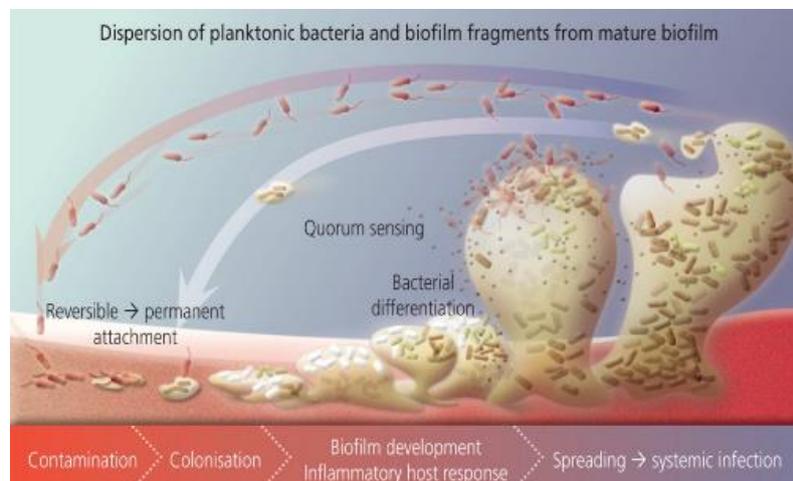


Figura 1. Representação esquemática da formação de biofilmes. Adaptado de: Phillips et al. (2010).

Os biofilmes desempenham um papel importante na virulência do microrganismo, bem como são um importante mecanismo de proteção e resistência a antimicrobianos. Antimicrobianos usados no tratamento de mastite clínica, como gentamicina (aminoglicosídeo) e enrofloxacina (quinolona) em concentrações subinibitórias induzem a formação de biofilme por *E. coli* isolada de mastite bovina [23].

Em resposta a estímulos externos, a produção de biofilme está relacionada com vários genes que codificam várias moléculas, como proteínas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS, do inglês *extracellular polymeric substances*) envolvidas no desenvolvimento e fixação de biofilmes [23].

Os biofilmes podem estar na origem da mastite crônica, pois representam um reservatório bacteriano na glândula mamária dos animais bastante resistente a processos de limpeza e higiene. Representam ainda uma potencial ameaça para a segurança e qualidade dos alimentos.

Neste sentido, a presença de biofilmes deve ser evitada na indústria dos laticínios devido ao risco de contaminação do leite, intoxicação alimentar e até ocorrência/recorrência de mastite bovina [27]. A descoberta de agentes antimicrobianos capazes de controlar estes microrganismos patogênicos na indústria dos laticínios é de extrema importância, principalmente aqueles responsáveis pela formação de biofilmes.

Portanto, devido à rápida e emergente resistência às terapias convencionais, é de elevada importância identificar e estabelecer alternativas de controle eficazes e seguras, nomeadamente alternativas naturais.

1.4. Terapias usadas

Atualmente, as terapias usadas no tratamento da mastite bovina estão a tornar-se ineficazes devido à abundância e diversidade de microrganismos patogênicos existentes e também à resistência destes a determinadas terapias, principalmente ao uso de antibióticos [11].

Na indústria dos laticínios, os antibióticos são usados maioritariamente para o tratamento desta doença e são a terapia mais usada atualmente, apesar da sua baixa taxa de eficácia quando usados a nível intramamário [24]. Contudo, o uso excessivo destes e a formação de biofilmes pode provocar uma maior resistência dos microrganismos patogênicos sendo cada vez mais crítica a ineficácia dos antibióticos [28]. Para além disso, os elevados custos associados a estes tratamentos e a presença de resíduos de antibióticos no leite para consumo humano, podem ser um fator para a procura de novas terapias [11].

Para bactérias que residem intracelularmente, na glândula mamária, torna-se mais difícil o contacto com antibióticos, dificultando o tratamento. *S. aureus* é um exemplo deste caso, sendo a percentagem de cura, com pirlimicina, bastante baixa [29]. Por outro lado, um tratamento com novobiocina resulta em melhores resultados [4]. De acordo com um estudo de Dias *et al.* (2013), foi provada a resistência de *S. aureus* a antibióticos como penicilina e ampicilina [30]. Por isso, as terapias existentes atualmente para o tratamento de mastite bovina provocada por esta bactéria demonstraram ser ineficazes [29], [30].

Algumas terapias alternativas, que estão descritas em pormenor no capítulo seguinte, já são usadas atualmente como terapia complementar aos antibióticos ou para substituição destes no tratamento da mastite bovina. O tratamento com oxitocina é usado como terapia acessória para mastites coliformes agudas e subagudas [31]. O uso de péptidos antimicrobianos naturais, como a nisina A e nisina Z, têm atividade germicida contra *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* de origem mastítica [10]. Algumas plantas também são usadas em mastite bovina, no sentido de ultrapassar a resistência a antibióticos, nomeadamente a *Terminalia chebula* e *Terminalia bellerica* [32]. Algumas vacinas, testadas na última década, também são usadas no combate à mastite bovina, especialmente contra infeções com *S. aureus* [4].

1.5. Terapias alternativas

A propagação de estirpes resistentes a antimicrobianos juntamente com o surgimento lento de novos antibióticos, levou a que fosse necessário recorrer a terapias alternativas e eficazes no tratamento de doenças e infeções provocadas por microrganismos patogénicos, nomeadamente a mastite bovina [33]. Inúmeras terapias alternativas estão a ser testadas para substituição dos antibióticos [34]. No entanto, estas devem ser não-tóxicas, de fácil eliminação, estáveis através do trânsito gastrointestinal (com nenhum ou pouco efeito sobre a flora intestinal residente), facilmente decompostas e amigas do ambiente, melhorar a eficiência alimentar, promover o crescimento animal, e o mais importante, não promotoras de resistência [35].

Nesta secção estão discutidas algumas das novas estratégias, cujo objetivo é substituir ou servir como complemento aos antibióticos atuais e atuar contra estirpes resistentes. Estas estratégias estão divididas de acordo com o seu mecanismo de ação, indireto ou direto. As vacinas, probióticos e anticorpos IgY, atuam de forma indireta [34] enquanto que os fagos, os inibidores de quorum sensing, as nanopartículas (NPs), as bacteriocinas, péptidos antimicrobianos e fitocompostos inibem diretamente o crescimento bacteriano, atuando os 3 últimos a nível da membrana celular.

1.5.1. Vacinas

As vacinas produzidas através de métodos recombinantes podem ser um método alternativo eficaz pois restringem a replicação bacteriana, previnem a seleção de variantes e ultrapassam a pressão seletiva no ambiente [36]. Várias abordagens estão a ser investigadas para o desenvolvimento de vacinas

contra *S. aureus* e outros microrganismos patogénicos em mastite bovina [37]–[39]. Como exemplo, foi desenvolvida uma vacina composta por três estirpes de *S. aureus* derivados de casos de mastite bovina. Vacas vacinadas tiveram 70% de proteção contra infeções em comparação com menos de 10% nos controlos. Contudo, independentemente de terem sido infetadas ou não por *S. aureus*, exibiram reações inflamatórias [38]. Apesar da vacinação poder ser uma importante ferramenta contra as estirpes resistentes, várias estirpes em evolução podem escapar à imunidade induzida pela administração de vacinas. Assim, é necessária uma atualização regular da estirpe vacinal [37]. Há uma necessidade de desenvolver vacinas mais seguras, potentes e melhor caracterizadas, com uma proteção mais ampla contra múltiplos microrganismos patogénicos. No entanto, há que ter em conta, que o desenvolvimento de vacinas requiere seguir um conjunto de procedimentos de qualidade e segurança, para além das regras de qualificação e registo [40].

1.5.2. Probióticos

Outra alternativa é o conceito emergente de probióticos mamários. Para este propósito, as bactérias do ácido láctico (LAB, do inglês *lactic acid bacteria*) são potenciais candidatas devido ao seu status de Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS, do inglês Generally Recognized As Safe) e suas reconhecidas propriedades inibitórias [41]. Existem estudos onde as suas propriedades benéficas foram exploradas no contexto da mastite bovina principalmente *in vitro* [42]–[44].

Num estudo realizado por Pellegrino et al. (2018), foi possível analisar a atividade antimicrobiana e a co-agregação contra bactérias causadoras de mastite de algumas LAB. Duas delas, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1655 e *Lactobacillus perolens* CRL 172 foram selecionadas por apresentarem um padrão interessante de adesão às células epiteliais do canal do teto bovino, inibição de patogénicos e co-agregação com 100% dos patogénicos testados. Estas estirpes selecionadas apresentam características indispensáveis para serem incluídas como probiótico na prevenção da mastite bovina [44].

1.5.3. Anticorpos IgY

De acordo com vários estudos, os anticorpos da gema do ovo de galinha (IgY) revelaram resultados promissores contra microrganismos patogénicos causadores de mastite bovina, nomeadamente *S. aureus* e *E. coli* [45], [46].

IgY específicos contra o tipo 5 (IgY-T5), tipo 8 (IgY-T8) e tipo 336 (IgY-T336) de estirpes de *S. aureus* foram obtidos por imunização de galinhas com vacinas de células inteiras. Os resultados

mostraram que apenas o IgY-T336 inibiu significativamente o crescimento de todas as estirpes. No entanto um teste de internalização indicou que todos os IgY específicos bloquearam de forma significativa a internalização das suas estirpes homólogas por células epiteliais mamárias de bovino. Esses resultados sugeriram que a pesquisa sobre a aplicação de IgY como tratamento para mastite causada por *S. aureus* deveria ser focada na atividade de inibição da internalização, e não na atividade de inibição do crescimento [45].

Um estudo idêntico realizado em *E.coli* revela ausência de crescimento quando são adicionados IgY específicos numa cultura de *E.coli*, sugerindo que os IgY possam ser usados como terapia contra a mastite bovina [46].

1.5.4. Fagos

A terapia com fagos pode ser uma boa alternativa para os antibióticos. Os bacteriófagos líticos, responsáveis pela infecção e lise das bactérias, são considerados seguros e com alvos específicos podendo ser explorados como potenciais agentes terapêuticos contra a mastite bovina [34]. Vários estudos recentes suportam o efeito benéfico da aplicação de bacteriófagos líticos isolados de vacas com mastite contra *S. aureus*, *E. coli* e MRSA (*Methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus*) [30], [47]–[49]. No entanto, existem limitações ao seu uso tais como: a exigência de múltiplos fagos para o controlo de múltiplos microrganismos patogénicos, o conhecimento do agente infeccioso e a sua eficácia estarem dependentes da acessibilidade e concentração do agente patogénico alvo. [34].

1.5.5. Inibidores de *quorum sensing*

O *quorum sensing* (QS) é um mecanismo que auxilia as bactérias na comunicação e coordenação entre si e o ambiente circundante e tem sido proposto como um dos mecanismos bacterianos que contribuem para sua patogenicidade [50]. Os inibidores de *quorum sensing* podem controlar a virulência de microrganismos patogénicos inibindo a ligação de auto-indutores aos respetivos recetores, na membrana celular bacteriana [34]. Qualquer agente que interrompa a comunicação bacteriana e a patogenicidade associada pode contornar a maioria dos mecanismos de resistência conhecidos [51].

Uma abordagem alternativa tem como alvo o sistema QS bacteriano. A hamamelitanina foi previamente sugerida para bloquear o QS através do recetor TraP afetando a síntese da parede celular e a libertação extracelular de DNA de *S. aureus*, aumentando a suscetibilidade dos biofilmes de *S.aureus* a antibióticos. Testes realizados num modelo de infecção de glândula mamária bovina com o isolado de mastite bovina *S. aureus* Newbould 30533 revelaram que o uso de apenas hamamelitanina não

apresenta resultados significativos, no entanto aumenta a suscetibilidade de *S. aureus* com o antibiótico habitualmente usado no tratamento da mastite bovina, cefalexina [52].

1.5.6. Nanopartículas

As NPs são cada vez mais estudadas devido às suas diversas aplicações, particularmente como veículos de transporte de agentes antimicrobianos. Vários estudos referem a aplicação de NPs contra a mastite bovina, principalmente contra *S. aureus* [11], [34].

Como exemplo, o efeito sinérgico das nanopartículas de prata e antibióticos foi avaliado, e uma combinação bem sucedida foi obtida usando antibióticos que inibem a tradução de proteínas, como a eritromicina, em combinação com nanopartículas de prata contra *S. aureus* [53]. Cardozo *et al.* demonstraram que as nanopartículas de óxido nítrico foram capazes de inibir *S. aureus* e, em geral, poderiam ser utilizadas no tratamento e prevenção da mastite bovina [54].

As ações antimicrobianas das NPs podem ser realizadas através da sua ligação à membrana bacteriana resultando na perturbação da integridade desta, alterações na parede celular, bloqueio das vias vitais das enzimas, etc. Para além disso, as NPs induzem stress oxidativo mediado pela produção de espécies reativas de oxigénio, resultando no dano irreversível dos componentes celulares bacterianos e consequentemente em morte celular [55]. No entanto, é necessário ter em conta preocupações ao nível da segurança, ambientais e sociais, bem como uma melhor compreensão dos seus mecanismos de ação [34].

1.5.7. Bacteriocinas

As LAB, referidas anteriormente, são conhecidas por sintetizar bacteriocinas, sendo a nisina a mais comumente explorada (obtida de *Lactococcus lactis*) [56]. Esta bacteriocina em combinação com lisostapina está associada à atenuação da formação de biofilmes de *S. aureus* em mastite bovina [57]. No entanto, existem algumas preocupações associadas ao uso de bacteriocina particularmente a sua baixa eficácia e dados de toxicidade insuficientes. Portanto, apesar dos avanços encorajadores, estes ainda não se encontram suficientemente otimizados para que as bacteriocinas sejam usadas de forma eficiente no tratamento da mastite bovina [34].

1.5.8. Péptidos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos estão distribuídos abundantemente pela natureza e estão entre as principais alternativas aos antibióticos [58]. Geralmente eles exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro contra bactérias e fungos [59]. Foram realizados vários estudos utilizando péptidos

antimicrobianos contra a mastite bovina, nomeadamente a esculentina 1–21 contra *S. agalactiae* [60]. Neste estudo, foram realizados testes *in vivo* que comprovam a eficácia deste antimicrobiano, ao fim de 5 dias de tratamento, causando uma regressão do estágio clínico da mastite bovina. Após caracterização biofísica, foi revelado que este péptido adota uma estrutura α -helicoidal em membranas mimetizadoras de bactérias e é capaz de permear a membrana de *S. agalactiae* de maneira dose-dependente [60].

1.5.9. Fitocompostos

As plantas possuem propriedades multifuncionais, principalmente devido à presença de variados fitocompostos bioativos secundários, nomeadamente, glicosídeos e alcalóides (álcoois, aldeídos, ésteres, éteres, cetonas, lactonas, etc.), antocianinas, cumarinas, flavonoides, compostos fenólicos (taninos), saponinas e terpenoides (mono e sesquiterpenos, esteroides, etc.) [61]. Assim, qualquer composto fitossanitário que exiba atividade antimicrobiana de amplo espectro pode ser usado como uma alternativa ideal aos antibióticos veterinários convencionais [62]. Os extratos de plantas são uma fonte rica em compostos fenólicos que têm sido reconhecidos pelo seu potencial antimicrobiano [63]. De facto, o uso de extratos de plantas tem ganho cada vez mais visibilidade, principalmente devido a apresentarem na sua composição compostos naturais com elevado poder antimicrobiano, não contaminando o leite para consumo humano [34]. Existem vários estudos que destacam a atividade antimicrobiana de várias espécies de plantas contra uma ampla gama de potenciais microrganismos patogénicos [64]–[66], nomeadamente os causadores de mastite bovina (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de extratos de plantas testados em microrganismos isolados de mastite bovina.

Nome científico (nome comum)	Parte da planta usada	Tipo de extrato	Microrganismo patogénico	CMI* (mg/mL)	Referência bibliográfica
<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto comum)	Folhas	Metanol:água	<i>S. aureus</i>	0,195– 0,39	[67]

<i>Terminalia chebula (Castanhola)</i>	Frutos	Acetato de etilo	<i>Bacillus megaterium</i>	-	[9]
<i>Plectranthus ornatos (Boldo rasteiro)</i>	Folhas	Diclorometano	<i>S. aureus</i>	0,4	[68]
<i>Melissa officinalis (Erva cidreira)</i>	Caule folhado	Metanol	<i>E. coli e S. aureus</i>	1x10 ⁶	[69]
<i>Hydrocleys nymphoides (Planta aquática)</i>	Folhas	Etanol	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,6	[28]

Gomes *et al.* (2018), testaram vários extratos hidrometanólicos (HM) de plantas em *S. aureus* isolados de mastites bovinas, entre as quais *Eucalyptus globulus* e obtiveram resultados promissores, tendo obtido uma CMI de 0,195–0,39 mg/mL, resultando numa elevada atividade antibacteriana [67]. Por sua vez Kher *et al.* (2018) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de *Terminalia chebula* (acetato de etilo) revelando-se o mesmo padrão de efetividade numa concentração de 500 µg/mL comparado com o antibiótico amoxicilina, podendo ser uma alternativa natural ao uso de antibióticos contra a mastite subclínica [9]. Foi também avaliada a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais de *Origanum floribundum* Munby. (orégãos), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) e *Thymus ciliatus* Desf. (tomilho) contra *Candida albicans*, obtendo-se uma CMI de 15,02-31,08 mg/mL [70]. Um estudo realizado em *Tinospora cordifolia*, outra planta medicinal, revelou que esta possui propriedades antibacterianas e imunomodulatórias contra mastite bovina subclínica [71]. Um estudo em que se avaliou a atividade antibacteriana de vários diterpenos obtidos de diferentes espécies de plantas revelou que o resultado mais promissor foi obtido com o ácido copálico obtido de *Copaifera langsdorffii* (copaibeira), com valores de CMI entre 1,56-6,25 µg/mL [72].

Existem alguns estudos que investigaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas em biofilmes de *S. aureus* isolados de mastites bovinas [28], [73]. Rossi *et al.* (2011) mostraram que extratos de plantas aquáticas, como *Salvinia auriculata* Aubl. (extrato de hexano) e *Hydrocleys nymphoides* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Buchenau (extrato etanólico) foram capazes de inibir quase 50% do biofilme

de *S. aureus*, enquanto Diaz *et al.* (2010) observaram um efeito significativo quando foram utilizados extratos etanólicos de *Senna macranthera* (cássia) e *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), extrato de *Artemisia absinthium* (absinto) (diclorometano) e extrato de *Cymbopogon nardus* (citronela) (etanol:água, 80:20) em biofilmes de *S. aureus*.

Existe, portanto, um interesse cada vez maior na adoção de fitocompostos como agentes terapêuticos no tratamento de mastites bovinas. Contudo, a maioria dos resultados requer estudos adicionais *in vivo* para validação dos resultados obtidos. Para além disso, existem restrições associadas à aplicação de fitocompostos na criação de animais, especialmente os animais leiteiros, nomeadamente a combinação complexa de compostos bioativos e a variação na composição devido a vários fatores biológicos, de processamento e de armazenamento [74]. É necessário também padronizar as unidades de aplicação, estudar o seu modo de ação, toxicidade, segurança e estabilidade, etc., de modo a poder estabelecê-los como uma alternativa efetiva aos antibióticos [34].

1.5.10. Ácido Rosmarínico

O AR é um composto que ocorre naturalmente e mais frequentemente em várias plantas da família das Lamiaceae e foi identificado como o composto fenólico principal em muitas plantas antimicrobially ativas, por exemplo, nos géneros *Mentha*, *Melissa*, *Lycopus*, *Origanum*, *Thymus* e *Salvia* [75]. A atividade antimicrobiana do AR já foi comprovada em bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como em leveduras [76]–[81]. O AR possui essencialmente atividade antimicrobiana contra estirpes de *E. coli*, *S. aureus*, *Candida albicans*, entre outras [81], [82].

De acordo com Shahidi *et al.*, a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é principalmente devido à inativação de enzimas celulares que são dependentes da taxa de penetração dos compostos na célula ou da sua capacidade de causar alterações na permeabilidade da membrana [83].

De acordo com os estudos mais recentes, o AR poderá ser um potencial candidato como agente antimicrobiano com atividade bactericida em formas planctónicas de estirpes clínicas de *S. aureus* e atividade bacteriostática nas fases iniciais do desenvolvimento do biofilme [76], [80], [81], [84]. Em concentrações subinibitórias perto da CMI, este composto suprimiu a produção de biofilme de *S. aureus*; no entanto, com novas diminuições da concentração de AR, foi observado um aumento na produção de biofilme, que atingiu o seu pico em concentrações 100 vezes menores do que a CMI [76]. Um fenómeno semelhante de resposta dependente de concentração na produção de biofilme foi observado no caso de muitos outros agentes antimicrobianos, como uma expressão de resposta ao stresse bacteriano

modulada por baixas concentrações de compostos químicos, como etanol ou antibióticos [85]–[87] . Portanto, o fenômeno descrito acima deve ser testado e considerado na determinação das concentrações terapêuticas dos potenciais fármacos de origem vegetal, pois a subdosagem pode ter efeitos contraproducentes nas infecções relacionadas ao biofilme.

Embora ainda existam poucos estudos sobre a atividade antimicrobiana do AR, Abedini *et al.* (2013) verificaram que o ácido rosmarínico e seu éster metílico, obtidos a partir do extrato hidrometanólico de *Hyptis atrorubens* (hortelã), demonstraram atividade antibacteriana. Também foi verificado que o AR apresentou maior capacidade bactericida contra *Stenotrophomonas maltophilia* e *S. epidermidis* [88]. O mecanismo de ação do ácido rosmarínico contra patógenos ainda não é conhecido, embora Bais *et al.* (2002) demonstraram que esse ácido fenólico danificou a superfície celular de *Aspergillus niger* e causou um aumento na divisão espacial e na condensação do DNA de *P. aeruginosa*. Portanto, o AR pode contribuir para a bioatividade dos extratos de *O. majorana* e *S. montana* [89].

Um estudo realizado em ratinhos com mastite demonstrou que o tratamento com AR atenuou significativamente o dano estrutural mamário [90]. Portanto, o AR pode ser uma excelente alternativa para o controle e tratamento da mastite bovina, uma vez que para além de um ótimo antimicrobiano, não apresenta toxicidade e é facilmente removido do organismo [91].

1.6. Objetivos

Por conseguinte, o principal objetivo deste trabalho é avaliar o potencial do AR e alguns extratos de plantas como agentes bioativos e como potencial alternativa aos antimicrobianos tradicionais habitualmente usados no tratamento de mastite bovina e na gestão da indústria de laticínios.

Para isso, determinou-se a atividade antibacteriana do AR em células planctónicas e biofilmes de *S. aureus*, recorrendo a métodos de avaliação de suscetibilidade a antibacterianos, tais como, o método de difusão em disco e o método de microdiluição, determinando a CMI, determinação de unidades formadoras de colónias; e avaliou-se sinergeticamente a combinação do AR com o extrato hidrometanólico de alcaçuz.

Capítulo 2 – Materiais e métodos

2.1. Meios de cultura e condições de crescimento

S. aureus ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 foram incubadas num matraz com 20 mL de meio “*Tryptic Soy Broth*” (TSB), a partir de placas de “*Tryptic Soy Agar*” (TSA) com menos de dois dias, durante 18 ± 2 h (*overnight*) a 37 °C e com agitação a 120 rpm. De seguida, e após centrifugação (5 min, 9500

g e 4 °C), as células foram recolhidas e ressuspensas em TSB e ajustadas para uma densidade ótica (DO) (620 nm) equivalente a 1×10^9 células/mL, e utilizadas nos ensaios subsequentes.

2.2. Preparação da solução de ácido rosmarínico

A solução stock de AR foi preparada dissolvendo-se 50 mg de AR (Sigma-Aldrich) em 1 mL de metanol a 50 % (v/v), a partir da qual foram preparadas várias diluições.

2.3. Preparação dos extratos de plantas

Os extratos usados neste estudo foram os extratos hidrometanólico (HM), hidroetanólico (HE), decocção e infusão de *G. glabra* L (alcaçuz) e os extratos hidroetanólicos de *E. australis* (urze), *P. vulgaris* (prunela) e *C. tridentatum* (carqueja). Estes extratos (liofilizados) foram gentilmente cedidos pela Dra Isabel Ferreira do Instituto Politécnico de Bragança (IPB). As soluções stock dos extratos foram preparadas através da sua ressuspensão em água de modo a obter-se concentrações de 50 mg/mL e a partir das quais foram preparadas várias diluições.

2.4. Determinação da atividade antimicrobiana em células planctónicas

A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de difusão em disco e pela determinação da concentração mínima inibitória pelo método de microdiluição, de acordo com o descrito por Gomes *et al.* (2018).

2.4.1. Efeito dos solventes na atividade antimicrobiana

Foram realizadas diluições em série (1:2, v/v) dos solventes (etanol e metanol), a concentrações que variam de 0,1% a 50% v/v, em placas de 96 poços. Foi adicionado 100 µL do inóculo (*S. aureus* ATCC 25923), preparado anteriormente, de modo a obter-se uma concentração celular final de 5×10^6 células/mL. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h. Após este período de incubação, foi medida a $DO_{620\text{ nm}}$ e avaliada a atividade antimicrobiana dos solventes testados.

2.4.2. Difusão em disco

A partir do inóculo preparado conforme descrito na secção 2.1. foram preparadas diluições (1:1000) de *S. aureus* e *E. coli* em TSB para se obter uma concentração celular final de 1×10^6 células/mL.

Cerca de 300 µL da suspensão celular de *S. aureus* e *E. coli* foram distribuídas em placas contendo meio TSA, utilizando-se a técnica do espalhamento. 25 µL de AR (1,25 e 2,5 mg/mL) e de

extratos de plantas (50 mg/mL) foram adicionados a discos estéreis distribuídos na placa. Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h. Após este período de incubação foi feita a determinação do efeito inibitório do AR e dos extratos através da medição das zonas de inibição e a atividade antibacteriana expressa em termos do seu diâmetro médio (mm).

2.4.3. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

O método da microdiluição em meio de cultura é o método mais utilizado para determinação da CMI e baseia-se na avaliação quantitativa da atividade de um agente antimicrobiano na presença de um microrganismo patogénico.

As CMIs foram obtidas através de diluições em série (1:2, v/v) dos antimicrobianos (AR e extratos de plantas) em placas de 96 poços, cujas concentrações variaram de 0,049 mg/mL a 12,5 mg/mL, e ajustando a concentração celular final para 5×10^5 células/mL. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Após incubação, o crescimento bacteriano resultante foi avaliado e determinada a CMI definida como sendo a concentração mais baixa de um antimicrobiano que impede o crescimento do microrganismo a testar (em comparação com o controlo positivo). Em seguida, o número de células viáveis foi avaliado pela determinação do número de unidades formadoras de colónias (UFCs) através do plaqueamento de diferentes diluições em meio TSA. Após 24 h de incubação a 37 °C, o número de colónias formadas foi contado e os resultados apresentados em Log UFCs. As experiências foram realizadas em triplicado e em três ensaios independentes.

2.5. Determinação da atividade antimicrobiana em biofilmes

2.5.1. Na formação inicial do biofilme

S. aureus, na concentração de 2×10^8 células/mL, foi incubada com AR (nas concentrações de 6,25 e 12,5 mg/mL) numa microplaca de 96 poços durante 24h, 37°C e 120 rpm com o objetivo de se verificar a ação antimicrobiana deste composto fenólico na formação inicial do biofilme. Após 24h, o meio de cultura foi removido e os biofilmes foram lavados duas vezes com NaCl 0,9% v/v para retirar as células não aderidas. O biofilme foi raspado e ressuspenso em NaCl 0,9% v/v. A partir desta suspensão celular foram feitas diluições em série de 1:10 para se proceder à contagem de UFCs.

2.5.2. Em biofilmes pré-formados

S. aureus, na concentração de 1×10^6 células/mL, foi incubada numa microplaca de 96 poços durante 24h, 37°C e 120 rpm. Depois da incubação, o meio de cultura foi descartado e foi adicionado

AR (nas concentrações de 6,25 mg/mL e 12,5 mg/mL) ao biofilme pré-formado. Colocou-se novamente as células a incubar durante 24h, 37°C e 120 rpm.

Após as 24h, o meio de cultura foi descartado e os biofilmes foram lavados duas vezes com NaCl 0,9% v/v. As células do biofilme foram depois raspadas e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9% v/v). A suspensão celular resultante foi diluída em série (1:10) para se proceder à contagem de UFCs.

2.6. Avaliação sinérgica do ácido rosmarínico e do extrato hidroetanólico de alcaçuz

2.6.1. Método de checkerboard

O método de checkerboard é normalmente usado para medir a inibição interativa entre dois compostos e, neste caso, foi usado para determinar o efeito sinérgico entre o AR (composto A) e o extrato hidroetanólico de alcaçuz (composto B) em *S. aureus*. Numa microplaca de 96 poços foram feitas diluições em série 1:2 dos dois compostos a testar, a concentrações que variaram de 0,195 a 6,250 mg/mL do composto A e 0,002 a 0,781 mg/mL do composto B. A microplaca foi incubada a 37°C durante 24h.

2.6.2. Determinação dos índices de concentração inibitória fracionária ("FICI")

O efeito combinado de AR com o extrato hidroetanólico de alcaçuz em *S. aureus* foi avaliado a partir dos valores de FICI para cada combinação usada no método de checkerboard. Depois da determinação da CMI de cada composto isolado, foi possível determinar o FICI de cada combinação através da expressão 1 e avaliar o efeito antimicrobiano dos agentes antimicrobianos isoladamente e em combinação.

$$FICI = FIC_A + FIC_B \quad (1)$$

onde,

$$FIC \text{ do composto A (FIC}_A) = \frac{CMI \text{ do composto A em combinação}}{CMI \text{ do composto A}}$$

$$FIC \text{ do composto B (FIC}_B) = \frac{CMI \text{ do composto B em combinação}}{CMI \text{ do composto B}}$$

A interação entre dois compostos foi considerada sinérgica se $FICI \leq 0,5$, aditivo se $0,5 < FICI \leq 1$, indiferente se $1 < FICI \leq 2$ e antagonista se $FICI > 2$ [92].

2.7. Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente, recorrendo ao software Excel, para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) utilizando o teste ANOVA (fator único).

Capítulo 3 – Resultados e discussão

3.1. Atividade antimicrobiana do ácido rosmarínico

3.1.1. Efeito dos solventes usados na preparação das soluções stock

O etanol e o metanol são frequentemente usados como solventes para compostos antibacterianos naturais e sintéticos. O efeito desses solventes no crescimento bacteriano é um fator importante a ter em conta, considerando a reprodutibilidade dos estudos de suscetibilidade antimicrobiana [93].

O efeito de diferentes concentrações (0,1 a 50%) dos solventes usados, etanol e metanol, na preparação da solução *stock* do AR, foi avaliado na atividade antimicrobiana de *S. aureus* (figura 2). Verificou-se que ambos têm algum efeito antimicrobiano, no entanto o etanol foi o que apresentou um maior efeito inibitório em *S. aureus*. Nos ensaios subsequentes foi utilizado apenas o metanol como solvente, visto ser o que apresentou menor toxicidade para as células testadas.

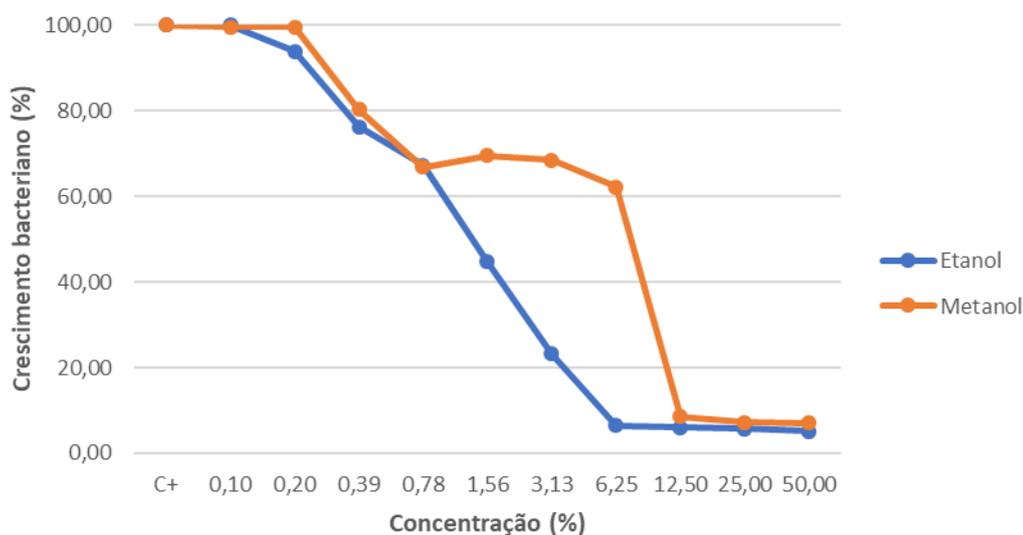


Figura 2. Atividade antimicrobiana do etanol e metanol em *S. aureus*.

Estes resultados vão de encontro aos resultados do estudo realizado por Wadhvani et al. (2009) onde foi possível verificar que todas as bactérias testadas (*S. epidermidis* MTCC 435, *P. oleovorans*

MTCC 617, *V. cholerae* MTCC 3906, *S. flexneri* MTCC 1457 e *S. paratyphi A*) apresentaram um decréscimo significativo no crescimento apenas a partir de uma concentração de 4% de metanol. Para o etanol o crescimento bacteriano é afetado significativamente a partir de uma concentração de 1% [93].

Deste estudo concluiu-se que se deve ter em conta que o solvente escolhido seja compatível com o estudo em questão. Os solventes não aquosos podem ser tóxicos para os organismos de teste. Os testes utilizados para determinar a concentração de solvente acima do qual a toxicidade ocorre devem sempre ser realizados antes da experiência. É de suma importância assegurar que a concentração final dos solventes não interfira com o ensaio. É aconselhável manter a concentração de qualquer solvente no nível mais baixo possível no ensaio, no entanto, pode ser difícil em alguns casos. Mesmo as concentrações mais baixas destes solventes, que não têm efeito aparente no crescimento bacteriano, podem ainda potenciar o efeito do composto antibacteriano em teste [93].

3.1.2. Células planctónicas

A atividade antimicrobiana do AR em *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 foi determinada, inicialmente, através do método de difusão em disco. Por se tratar de uma técnica qualitativa, este método foi utilizado como uma triagem preliminar da atividade antimicrobiana do AR. Os resultados obtidos demonstraram que não houve inibição do crescimento bacteriano utilizando diferentes concentrações deste antimicrobiano (1,25 e 2,5 mg/mL). O solvente usado na preparação da solução stock de AR também não afetou o crescimento bacteriano (controlo negativo).

Os resultados obtidos num estudo realizado por Moreno et al. corroboram os obtidos neste estudo, embora tivessem sido utilizadas concentrações mais baixas de AR (0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL) em *S. aureus* ATCC 25922 com uma concentração celular final de 10^2 - 10^3 UFC/mL [77]. Contudo, um estudo mais recente contraria os resultados obtidos com concentrações de AR (isolado da planta *Adenium obesum*) de 0,0005 mg/mL e 0,001 mg/mL em que obtiveram um diâmetro de zona de inibição de 10 ± 0.05 e 12 ± 0.17 mm, respetivamente, em *S. aureus* [94].

A CMI do AR foi avaliada pelo método de microdiluição em meio TSB com o objetivo de determinar a concentração mais baixa necessária para inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923.

A CMI do AR obtida foi de 3,13 mg/mL. De acordo com os resultados da figura 3 foi possível observar que houve uma diminuição da viabilidade com o aumento da concentração de AR. O solvente, nas concentrações usadas, não evidenciou efeito inibitório.

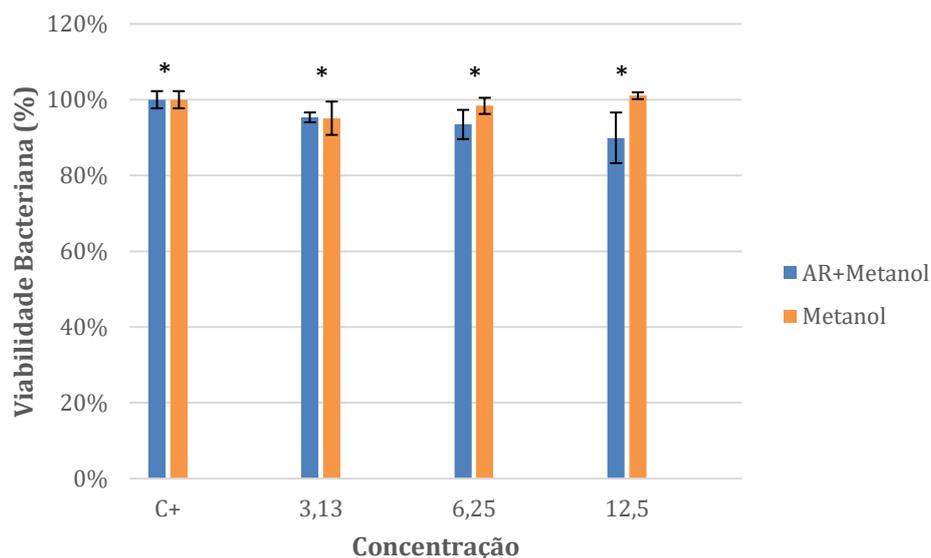


Figura 3. Unidades formadoras de colónias (UFC) de células planctónicas de *S. aureus* expostas a diferentes concentrações de AR (mg/mL) e metanol (% v/v). As barras representam a média e o erro o desvio-padrão de pelo menos três experiências independentes. Foram analisadas diferenças estatísticas utilizando o teste ANOVA (fator único), com * a representar diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

No entanto, vários autores obtiveram uma CMI de AR em *S. aureus* abaixo da obtida neste estudo, nomeadamente 0,8 mg/mL para *S. aureus* ATCC 25923 [95], 0,005 mg/mL para *S. aureus* ATCC 25922 (concentração de celular final de 10^2 - 10^3 UFC/mL) [77], 1,25 mg/mL em *S. aureus* CCM 4750 e *S. aureus* CCM 4223 [96]. Contudo, neste último estudo, o solvente usado foi o etanol, o que pode ter tido algum efeito inibitório juntamente com o AR.

3.1.3. Formação inicial do biofilme

Uma alternativa ao controlo da formação de biofilme é prevenir a colonização das células em superfícies bióticas ou abióticas. Assim, foi avaliada a capacidade do AR inibir a formação de biofilmes. A figura 4 mostra o efeito antimicrobiano do AR na formação inicial do biofilme de *S. aureus*. A redução da viabilidade das células expostas ao AR na concentração de 12,5 mg/mL é de 15% verificando-se, portanto que o AR tem pouco efeito antimicrobiano nas células testadas.

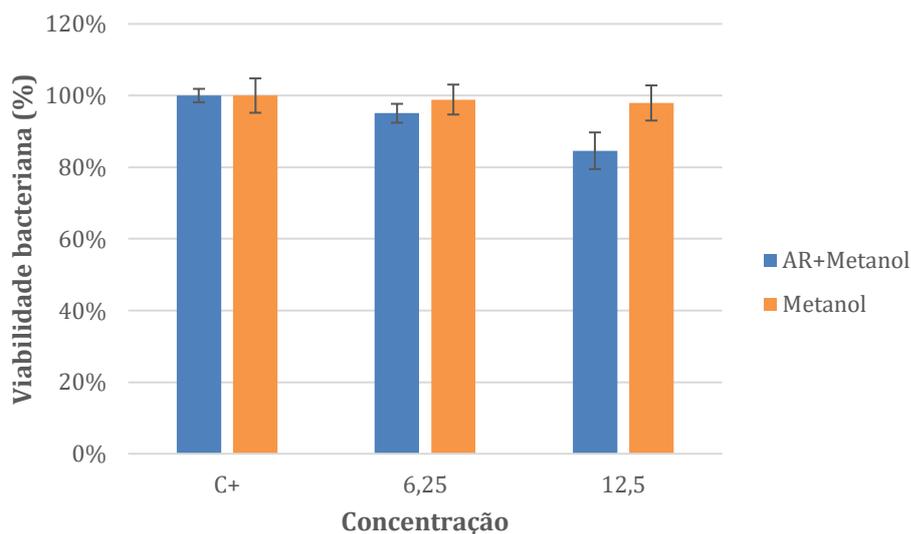


Figura 4. Atividade antimicrobiana do AR (mg/mL) e metanol (% v/v) testada a diferentes concentrações na formação inicial do biofilme de *S. aureus*. As barras representam a média e o erro o desvio-padrão de pelo menos três ensaios independentes..

De acordo com Neopane et al. (2018) é demonstrado que o *S. aureus* apresenta elevado grau de capacidade de formação de biofilme e que as estirpes produtoras de biofilme têm uma tendência muito elevada a exibir resistência antimicrobiana, nomeadamente à meticilina e a múltiplos fármacos [97]

Um estudo recente realizado por Devi e seus colaboradores (2016) demonstrou que o tratamento com apenas 1 mg/mL de AR originou uma redução de cerca de 70% em biofilmes de *Aeromonas hydrophila*. [98]

No entanto, até ao momento, não foram realizados estudos em que se testou AR na formação de biofilmes de *S. aureus*.

3.1.4. Biofilmes pré-formados

Os mecanismos de resistência dos biofilmes são multifatoriais e dependem de cada organismo. Esses mecanismos podem ser atribuídos a fatores como a redução da penetração de antimicrobianos através da matriz do biofilme, a presença de células de crescimento lento no biofilme, população bacteriana heterogênea com presença de subpopulações fenotípicas com diferentes níveis de resistência e presença de células persistentes (“persister cells”)[99].

Relativamente aos biofilmes pré-formados de *S. aureus*, através da figura 5, foi possível verificar uma inibição microbiana de apenas 12% com uma concentração de 12,5 mg/mL.

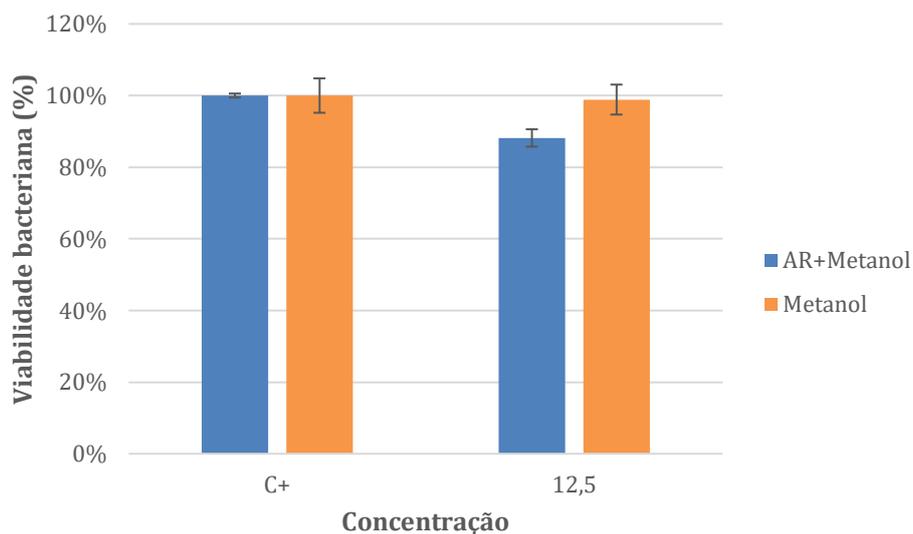


Figura 5. Atividade antimicrobiana do AR (mg/mL) e metanol (% v/v) em biofilmes pré-formados de *S. aureus*. As barras representam a média e o erro o desvio-padrão de pelo menos três experiências independentes..

Embora também não existam estudos em que se utilize o AR em biofilmes pré-formados de *S. aureus*, este resultado é o esperado pois apoia a evidência de que os biofilmes podem ser 10 a 1000 vezes mais resistentes que as células planctônicas [100].

3.2. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas

De forma a avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana de alguns extratos de plantas, utilizou-se o método de difusão em disco (Tabela 2). Entre os extratos de plantas testados, a urze (*Erica australis*) foi o extrato que apresentou a maior zona de inibição de crescimento em *S. aureus* (16 mm) seguida dos extratos hidrometanólicos e hidroetanólicos de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) (15 mm). Na decocção e infusão de alcaçuz praticamente não se visualizaram zonas de inibição de crescimento bacteriano na concentração testada (50 mg/mL). Por fim, os extratos hidroetanólicos de prunela (*Prunella vulgaris*) e carqueja (*Chamaespartium tridentatum*) apresentaram um diâmetro de inibição de crescimento bacteriano de cerca de 10 mm.

Tabela 2. Atividade antibacteriana de diferentes extratos de plantas em *S. aureus* ATCC 25923.

Extratos de plantas	Diâmetro das zonas de inibição (mm)
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (extrato HM)	15
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (extrato HE)	15
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (decoção)	1
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (infusão)	-
<i>Erica australis</i> (extrato HE)	16
<i>Prunella vulgaris</i> (extrato HE)	10
<i>Chamaespartium tridentatum</i> (extrato HE)	10

(-) Ausência de atividade antibacteriana

De acordo com a literatura [101], o extrato metanólico de *Glycyrrhiza glabra* L. exibiu elevada atividade antimicrobiana em *S. aureus* evidenciando um diâmetro de zona de inibição de cerca de 22 mm, sendo um pouco maior que a obtida neste estudo. Este facto pode ser devido a essas placas terem sido mantidas a baixa temperatura (4°C) por 24 horas para permitir a máxima difusão dos materiais de teste antes da incubação.

Posteriormente, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos foi realizada uma avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana do extrato em que se visualizou maior efeito antibacteriano, ou seja, extrato de urze e todos os extratos de alcaçuz, através de testes de suscetibilidade antimicrobiana (determinação da CMI e UFCs). Pelos resultados obtidos (Tabela 3 e Figura 6), ficou evidente o efeito bactericida de todos os extratos, no entanto nos extratos de urze e de alcaçuz (HE e HM), foi onde se evidenciou uma inibição completa do crescimento das bactérias de *S. aureus* com a CMI igual à concentração mínima bactericida (CMB). Dos extratos testados, o extrato HE de alcaçuz foi o que apresentou melhores resultados, apresentando o menor valor de CMI (0,098-0,19 mg/mL), seguido do extrato HM de alcaçuz (0,19 mg/mL), decoção de alcaçuz (3,13 mg/mL) e, por fim, infusão de alcaçuz e o extrato HE de urze (6,25 mg/mL).

Tabela 3. Concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos de plantas testados em *S. aureus*, determinada pelo método de microdiluição em meio TSB.

Extratos de plantas	Extração	CMI (mg/mL)
Urze	HE	6,25
Alcaçuz	HM	0,19
	HE	0,098-0,19
	Decocção	3,13
	Infusão	6,25

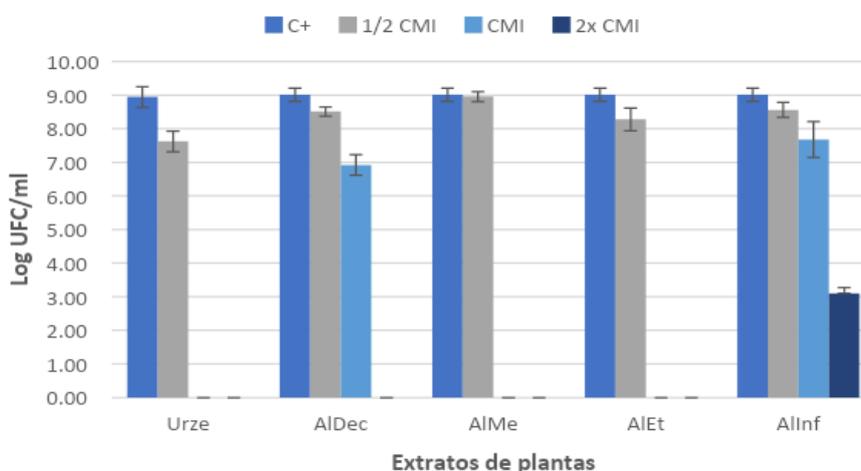


Figura 6. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* incubadas com concentrações acima e abaixo da CMI de diferentes extratos de plantas. AlDec: decocção de alcaçuz; AlMe: extrato HM de alcaçuz; AlEt: extrato HE de alcaçuz; AlInf: infusão de alcaçuz.

Outros estudos sugerem uma CMI acima da obtida para o extrato etanólico de alcaçuz (1,25 mg/mL) em *S. aureus* (ATCC 25923). Porém estes valores foram obtidos usando uma concentração celular final superior à usada neste estudo (1×10^8 UFC/mL) [102].

3.3. Avaliação sinérgica do ácido rosmarínico e extrato hidroetanólico de alcaçuz

Para melhorar a eficiência antimicrobiana do AR e do extrato HE de alcaçuz, bem como reduzir as concentrações usadas e determinar possíveis sinergias, investigou-se a atividade antimicrobiana de combinações dos dois compostos em *S. aureus* pelo método de *checkerboard*.

Os resultados resultantes do cálculo do FICI estão representados na figura 7. Em praticamente todas as combinações de AR (composto A) e extrato HE de alcaçuz (composto B), em que se verificou inibição de crescimento, verificaram-se interações indiferentes. Na combinação de $\frac{1}{2}$ do valor da CMI do composto A (3,125 mg/mL) e $\frac{1}{4}$ CMI do composto B (0,098 mg/mL) obteve-se uma interação aditiva. Na combinação de $\frac{1}{4}$ CMI do composto A e $\frac{1}{2}$ CMI do composto B foi possível verificar uma interação sinérgica.

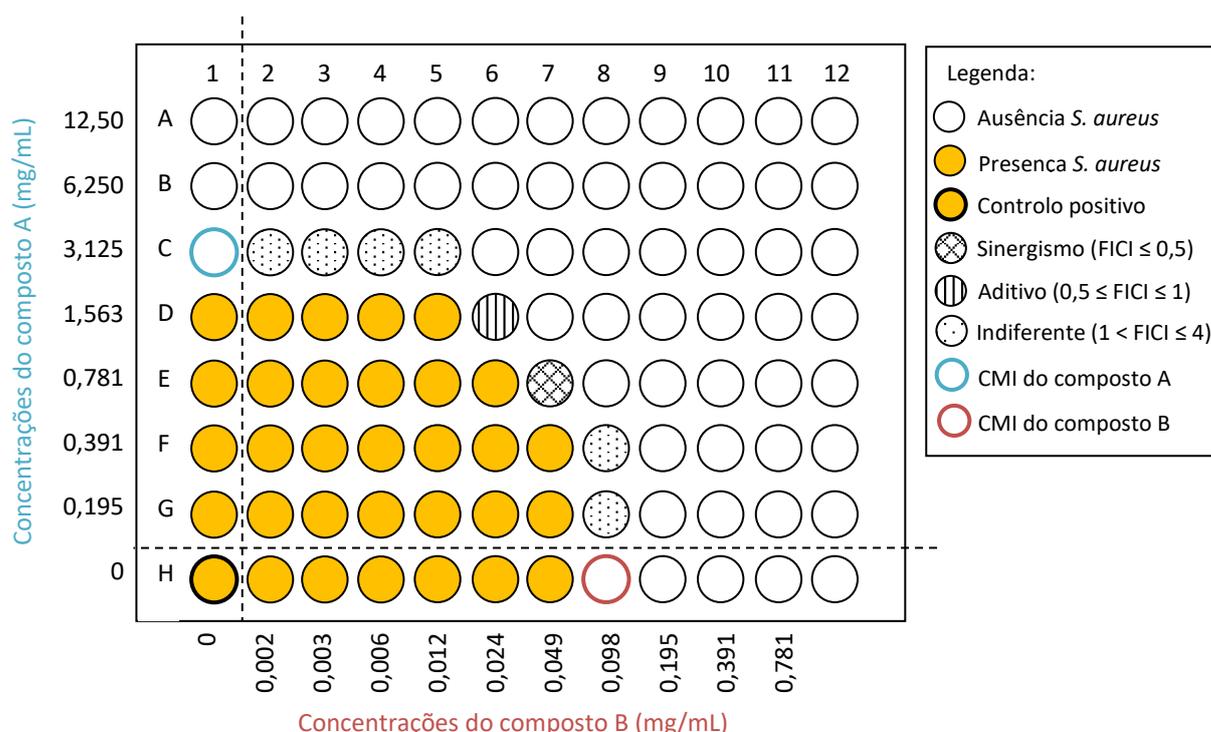


Figura 7. Representação esquemática dos resultados obtidos pelo método de checkerboard e respetivos FICI.

Poucos estudos foram realizados para avaliar sinergeticamente o AR com outros compostos ou extratos de plantas. No entanto, um estudo em que se combinou o AR com vários antibióticos, $\frac{1}{4}$ do valor da CMI do AR (0,8 mg/mL) reduziu 4 vezes o valor da CMI de vancomicina (20 mg/mL), amoxicilina (30 mg/mL), e ofloxacina (20 mg/mL) em *S. aureus* ATCC 25923 [95].

Concluindo, o AR pode atuar como um agente adjuvante confirmado pelo seu efeito sinérgico com o extrato HE de alcaçuz.

Capítulo IV – Considerações finais

A mastite bovina é uma patologia que causa graves problemas na indústria dos laticínios. Há uma resistência cada vez maior aos antibióticos atualmente usados para combater esta patologia, neste sentido, estão a ser estudadas alternativas mais eficazes e naturais. Neste trabalho foram testados agentes antimicrobianos nomeadamente AR e EP visando o combate da mastite bovina provocada por *S. aureus*.

O composto fenólico AR revelou ser mais eficaz em células planctónicas do que em biofilmes de *S. aureus*, obtendo-se uma CMI de 3,13 mg/mL e observando-se apenas um ligeiro efeito inibitório quer na formação de biofilmes quer em biofilmes pré-formados. Contudo, foi testada uma alternativa ainda mais natural, utilizando-se extratos de plantas. Neste caso, obteve-se uma CMI de 0,098-0,19 mg/mL quando usados os extratos HM e HE de *Glycyrrhiza glabra* L. Posteriormente, com o estudo da sinergia entre o AR e o extrato HE de *Glycyrrhiza glabra* L., foi possível verificar que ambos são mais eficazes quando combinados, obtendo-se um efeito sinérgico na combinação de $\frac{1}{4}$ CMI de AR e $\frac{1}{2}$ CMI do extrato HE de *Glycyrrhiza glabra* L..

Concluindo, o AR e o extrato de HE de *Glycyrrhiza glabra* L. têm potencial para serem usados em formulações com propriedades antimicrobianas no combate à mastite bovina.

Referências bibliográficas

- [1] L. Maréchal, L. Loir, L. Maréchal, e L. Loir, «Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products – a review To cite this version : HAL Id : hal-00930618», *Dairy Sci. Technol.*, vol. 91, n. 3, pp. 247–282, 2011.
- [2] P. Krishnamoorthy, K. P. Suresh, S. Saha, G. Govindaraj, B. R. Shome, e P. Roy, «Meta-analysis of Prevalence of Subclinical and Clinical Mastitis , Major Mastitis Pathogens in Dairy Cattle in India», *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 6, n. 3, pp. 1214–1234, 2017.
- [3] C. M. Duarte, P. P. Freitas, e R. Bexiga, «Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview», *J. Vet. Diagnostic Investig.*, vol. 27, n. 6, pp. 665–672, 2015.
- [4] R. Deb *et al.*, «Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review.», *Pakistan J. Biol. Sci. PJS*, vol. 16, n. 23, pp. 1653–1661, Dez. 2013.
- [5] S. Varshney, P. Varshney, S. K. Dash, M. K. Gupta, A. Kumar, e B. Bist, «Antibacterial activity of fruits of Terminalia chebula and Terminalia belerica against mastitis field isolates Antibacterial activity of fruits of Terminalia chebula and Terminalia belerica against mastitis field isolates», *Med. Plants*, vol. 4, n. 3, pp. 167–169, 2012.
- [6] A. J. Bradley, «Bovine Mastitis : An Evolving Disease», *Vet. J.*, vol. 164, pp. 116–128, 2002.
- [7] G. Leitner, O. Krifucks, M. D. Kiran, e N. Balaban, «Veterinary Immunology and Immunopathology Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows», *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 142, n. 1–2, pp. 25–35, 2011.
- [8] M. Oliveira *et al.*, «Time course of biofilm formation by and mastitis isolates To cite this version : HAL Id : hal-00532247», *Vet. Microbiol.*, vol. 124, n. 1–2, p. 187, 2007.
- [9] M. N. Kher, N. R. Sheth, e V. D. Bhatt, «In Vitro Antibacterial Evaluation of Terminalia chebula as an Alternative of Antibiotics against Bovine Subclinical Mastitis», *Anim. Biotechnol.*, 2018.
- [10] C. Bogni, L. Odierno, C. Raspanti, J. Giraud, e A. Larriestra, «War against mastitis : Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens», pp. 483–494, 2011.
- [11] F. Gomes e M. Henriques, «Control of Bovine Mastitis : Old and Recent Therapeutic Approaches», *Curr. Microbiol.*, 2015.
- [12] Y. D. N. Tremblay, D. Lamarche, P. Chever, D. Haine, S. Messier, e M. Jacques, «Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms», *J. Dairy Sci.*, vol. 96, n. 1, pp. 234–246, 2013.
- [13] F. Gomes, M. J. Saavedra, e M. Henriques, «Pathogens and Disease Advance Access published January 14, 2016», *Pathog. Dis.*, vol. 74, n. 3, pp. 1–19, 2016.
- [14] W. Vanderhaeghen, S. Piepers, F. Leroy, E. Van Coillie, F. Haesebrouck, e S. De Vliegher, «Invited review : Effect , persistence , and virulence of coagulase-negative Staphylococcus species associated with ruminant udder health», *J. Dairy Sci.*, vol. 97, n. 9, pp. 5275–5293, 2014.
- [15] É. Juhász-Kaszanyitzky *et al.*, «MRSA transmission between cows and humans», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 13, n. 4, pp. 630–632, 2007.

- [16] C. Walther e V. Perreten, «Letter to the Editor: Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* in Organic Milk Production», *J. Dairy Sci.*, vol. 90, n. 12, p. 5351, 2007.
- [17] S. Mahato, H. U. Mistry, S. Chakraborty, P. Sharma, R. Saravanan, e V. Bhandari, «Identification of variable traits among the methicillin resistant and sensitive coagulase negative staphylococci in milk samples from mastitic cows in india», *Front. Microbiol.*, vol. 8, n. JUL, pp. 1–7, 2017.
- [18] R. Seixas, J. P. Santos, R. Bexiga, C. L. Vilela, e M. Oliveira, «Short communication : Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal», *J. Dairy Sci.*, vol. 97, n. 1, pp. 340–344, 2014.
- [19] M. G. Basanisi, G. La Bella, G. Nobili, I. Franconieri, e G. La Salandra, «Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy», *Food Microbiol.*, vol. 62, pp. 141–146, 2017.
- [20] G. Di Bonaventura *et al.*, «Biofilm Formation by *Stenotrophomonas maltophilia* : Modulation by Quinolones, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Ceftazidime», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, n. 1, pp. 151–160, 2004.
- [21] J. B. C. Fernandes, L. G. Zanardo, N. N. Galvão, I. A. Carvalho, L. A. Nero, e M. A. S. Moreira, «*Escherichia coli* from clinical mastitis : serotypes and virulence factors», *J. Vet. Diagnostic Investig.*, vol. 23, n. 6, pp. 1146–1152, 2011.
- [22] S. F. Darwish e H. A. E. Asfour, «Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays», *Sci. World J.*, 2013.
- [23] V. Silva, L. Soares, A. Júnior, H. Mantonavi, Y.-F. Chang, e M. Moreira, «Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis.», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, n. 19, pp. 6136–45, 2014.
- [24] A. Raza, G. Muhammad, S. Sharif, e A. Atta, «Biofilm Producing *Staphylococcus aureus* and Bovine Mastitis : A Review», *Mol. Microbiol. Res.*, vol. 3, n. 1, pp. 1–8, 2013.
- [25] M. Monzón, C. Oteiza, J. Leiva, M. Lamata, e B. Amorena, «Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates : low performance of vancomycin in relation to other antibiotics», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 44, pp. 319–324, 2002.
- [26] G. G. M. Snel, M. Malvisi, R. Pilla, e R. Piccinini, «Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis», *Vet. Microbiol.*, vol. 174, n. 3–4, pp. 489–495, 2014.
- [27] P. D. C. Melo *et al.*, «NaOCl effect on biofilm produced by *Staphylococcus aureus* isolated from the milking environment and mastitis infected cows 1», *Pesqui. Veterinária Bras.*, vol. 34, n. 2, pp. 109–113, 2014.
- [28] C. C. Rossi, A. P. Aguilar, M. Alves, N. Diaz, e A. De, «Aquatic plants as potential sources of antimicrobial compounds active against bovine mastitis pathogens», *African J. Biotechnol.*, vol. 10, n. 41, pp. 8023–8030, 2011.
- [29] B. E. Gillespie *et al.*, «Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows.», *Vet. Ther.*, 2002.
- [30] R. S. Dias *et al.*, «Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from

- bovine mastitis 1», *Am. Soc. Anim. Sci.*, vol. 91, pp. 3930–3939, 2013.
- [31] D. J. Leininger, J. R. Roberson, F. Elvinger, D. Ward, e R. M. Akers, «Evaluation of frequent milkout for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis», *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 221, n. 1, 2003.
- [32] S. Varshney *et al.*, «Antibacterial activity of fruits of *Terminalia chebula* and *Terminalia belerica* against mastitis field isolates», *Med. Plants*, vol. 4, n. 3, 2012.
- [33] D. P. Elder, M. Kuentz, e R. Holm, «Antibiotic Resistance : The Need For a Global Strategy», *J. Pharm. Sci.*, vol. 105, n. 8, pp. 2278–2287, 2016.
- [34] C. Sharma *et al.*, «Antimicrobial Resistance : Its Surveillance , Impact , and Alternative Management Strategies in Dairy Animals», *Front. Vet. Sci.*, vol. 4, n. 237, pp. 1–27, 2018.
- [35] G. Cheng *et al.*, «Antibiotic alternatives : the substitution of antibiotics in animal husbandry ?», *Front. Microbiol.*, vol. 5, n. 217, pp. 1–15, 2014.
- [36] O. Merino, P. Alberdi, J. M. Pérez, D. Lastra, e J. De Fuente, «Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens», *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 3, n. 30, pp. 1–10, 2013.
- [37] J. Tiwari *et al.*, «Trends In Therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Vaccines & Vaccination Trends In Therapeutic and Prevention Strategies for Management of Bovine Mastitis : An Overview», *J. Vaccines Vaccin.*, vol. 4, n. 176, pp. 1–11, 2013.
- [38] G. Leitner, E. Lubashevsky, A. Glickman, M. Winkler, A. Saran, e Z. Trainin, «Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows I . Challenge trials», *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 93, pp. 31–38, 2003.
- [39] B.-A. TENHAGEN, D. EDINGER, B. BAUMGAË, P. KALBE, G. KLUË, e W. HEUWIESER, «Efficacy of a Herd-Specific Vaccine Against *Staphylococcus aureus* to Prevent Post-Partum Mastitis in Dairy Heifers», *J. Vet. Med. A*, vol. 48, pp. 601–607, 2001.
- [40] H. Poulet, J. Minke, M. Pardo, V. Juillard, B. Nordgren, e J.-C. Audonnet, «Development and registration of recombinant veterinary vaccines The example of the canarypox vector platform», *Vaccine*, vol. 25, pp. 5606–5612, 2007.
- [41] S. Even, R. Souza, L. Rault, e Y. Le Loir, «Mammary probiotics: a new jedi against bovine mastitis», em *Fifth beneficial microbes conference*, 2016.
- [42] D. S. Bouchard, L. Rault, N. Berkova, Y. Le Loir, e S. Even, «Inhibition of *Staphylococcus aureus* Invasion into Bovine Mammary Epithelial Cells by Contact with Live *Lactobacillus casei*», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, n. 3, pp. 877–885, 2013.
- [43] F. Armas, C. Camperio, e C. Marianelli, «In Vitro Assessment of the Probiotic Potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against Ruminant Mastitis-Causing Pathogens», *PLoS One*, vol. 12, n. 1, pp. 1–13, 2017.
- [44] M. S. Pellegrino, I. D. Frola, B. Natanael, D. Gobelli, M. E. F. Nader-macias, e C. I. Bogni, «In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Milk as Potential Probiotic Strains to Prevent Bovine Mastitis», *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2018.
- [45] L. Wang *et al.*, «Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*», *Vet. Microbiol.*, vol. 149, n. 3–4, pp. 415–421, 2011.

- [46] S. Meenatchisundaram, A. Michael, T. Subbraj, T. Diraviam, e V. Shanmugam, «Isolation , Purification and Neutralizing potential of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis causing Escherichia coli in dairy cows in Coimbatore District», *Int. J. Drug Dev. Res.*, vol. 3, n. 2, pp. 147–153, 2011.
- [47] M. Kwiatek, S. Parasion, L. Mizak, R. Gryko, M. Bartoszcze, e J. Kocik, «Characterization of a bacteriophage , isolated from a cow with mastitis , that is lytic against Staphylococcus aureus strains», *Arch. Virol.*, vol. 157, n. 2, pp. 225–234, 2012.
- [48] A. Hamza, S. Perveen, Z. Abbas, e S. U. Rehman, «The Lytic SA Phage Demonstrate Bactericidal Activity against Mastitis Causing Staphylococcus aureus», *Gruyter Open*, vol. 11, pp. 39–45, 2016.
- [49] P. Sankar, «New Therapeutic Strategies to Control and Treatment of Bovine Mastitis», *Vet. Med. Open J.*, vol. 1, n. 2, pp. 7–8, 2016.
- [50] M. Basavaraju, V. S. Sisnity, R. Palaparthi, e P. Addanki, «ScienceDirect Quorum quenching : Signal jamming in dental plaque biofilms», *J. Dent. Sci.*, vol. 11, n. 4, pp. 349–352, 2016.
- [51] A. K. Bhardwaj, K. Vinothkumar, e N. Rajpara, «Bacterial Quorum Sensing Inhibitors : Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance», *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, vol. 8, pp. 68–83, 2013.
- [52] G. Brackman, K. Breyne, R. De Rycke, A. Vermote, e F. Van Nieuwerburgh, «The Quorum Sensing Inhibitor Hamamelitannin Increases Antibiotic Susceptibility of Staphylococcus aureus Biofilms by Affecting Peptidoglycan Biosynthesis and eDNA Release», *Nat. Publ. Gr.*, n. September 2015, pp. 1–14, 2016.
- [53] J. Kazemi, M. Ahmadi, e H. D. Saei, «Antibacterial effect of silver nanoparticles along with protein synthesis-inhibiting antibiotics on Staphylococcus aureus isolated from cattle mastitis», *Biol. J. Microorg.*, vol. 2, n. 8, pp. 15–22, 2014.
- [54] V. F. Cardozo *et al.*, «Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against Staphylococcus aureus and Escherichia coli from bovine mastitis», *Int. J. Pharm.*, 2014.
- [55] C. S. Yah e G. S. Simate, «Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents», *DARU J. Pharm. Sci.*, vol. 23, n. 43, 2015.
- [56] T. M. Karpiński e A. K. Szkaradkiewicz, «Characteristic of Bacteriocines and their Application», *Polish J. Microbiol.*, vol. 62, n. 3, pp. 223–235, 2013.
- [57] H. Ceotto-Vigoder *et al.*, «Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of Staphylococcus aureus involved in bovine mastitis», *J. Appl. Microbiol.*, n. 121, pp. 101–114, 2016.
- [58] J. Narayana e J. Chen, «Peptides Antimicrobial peptides : Possible anti-infective agents», *Peptides*, vol. 72, pp. 88–94, 2015.
- [59] U. B. Cheema, M. Younas, J. I. Sultan, A. Iqbal, M. Tariq, e A. Waheed, «Antimicrobial peptides : An alternative of antibiotics in Ruminants Antimicrobial Peptides : An alternative of Antibiotics in Ruminants», *Adv. Agric. Biotechnol.*, vol. 2, pp. 15–21, 2011.
- [60] A. E. Islas-rodri guez, L. Marcellini, B. Orioni, D. Barra, L. Stella, e M. Mangoni, «Esculentin 1 –

- 21 : a linear antimicrobial peptide from frog skin with inhibitory effect on bovine mastitis-causing bacteria», *Journal Pept. Sci.*, vol. 15, pp. 607–614, 2009.
- [61] K. Dhama *et al.*, «Evidence based antibacterial potentials of medicinal plants and herbs countering bacterial pathogens especially in the era of emerging drug resistance: an integrated update.», *Int. J. Pharmacol.*, vol. 10, n. 1, pp. 1–43, 2014.
- [62] A. G. Atanasov *et al.*, «Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products : A review», *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, n. 8, pp. 1582–1614, 2015.
- [63] N. Martins, L. Barros, M. Henriques, S. Silva, e I. C. F. R. Ferreira, «Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species», *Ind. Crop. Prod.*, vol. 74, pp. 648–670, 2015.
- [64] G. Bachir e M. Benali, «Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*», *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 2, n. 9, pp. 739–742, 2012.
- [65] I. Ara, M. M. A. Shinwari, S. A. Rashed, e M. A. Bakir, «Evaluation of Antimicrobial Properties of Two Different Extracts of *Juglans regia* Tree Bark and Search for Their Compounds Using Gas Chromatography-Mass Spectrum», *Int. J. Biol.*, vol. 5, n. 2, pp. 92–102, 2013.
- [66] B. Abirami *et al.*, «Biosynthesis of silver nanoparticles derived *Acorus calamus* rhizome extract and their biomedical application», *J. Adv. Appl. Sci. Res.*, 2017.
- [67] F. Gomes *et al.*, «Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus* , the dairy industry pathogen», *Ind. Crop. Prod.*, vol. 112, pp. 515–520, 2018.
- [68] F. R. Nascimento, K. R. S. Albuquerque, e M. R. Oliveira, «Antibiotic activity of *Plectranthus ornatus* Codd ., a Traditional Medicinal Plant», *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 89, n. 3, pp. 2461–2469, 2017.
- [69] A. Sousa *et al.*, «Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis*», *Rev. Ciências la Salud*, vol. 14, n. 2, pp. 201–210, 2016.
- [70] S. Ksouri, S. Djebir, A. A. Bentorki, A. Gouri, e Y. Hadeif, «Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby , *Rosmarinus officinalis* L . and *Thymus ciliatus* Desf . against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis», *J. Mycol. Med.*, vol. 27, n. 2, pp. 245–249, 2017.
- [71] R. Mukherjee e G. C. Ram, «Evaluation of mammary gland immunity and therapeutic potential of *Tinospora cordifolia* against bovine subclinical mastitis», *Trop Anim Heal. Prod.*, vol. 42, pp. 645–651, 2010.
- [72] A. P. Fonseca *et al.*, «In Vitro Antimicrobial Activity of Plant-Derived Diterpenes against Bovine Mastitis Bacteria», *Molecules*, vol. 13, pp. 7865–7872, 2013.
- [73] M. A. N. Diaz *et al.*, «Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis», n. August, 2009.
- [74] G. Huyghebaert, R. Ducatelle, e F. Van Immerseel, «An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers», *Vet. J.*, vol. 187, n. 2, pp. 182–188, 2011.
- [75] J. L. Lamaison, C. Petitjean-Freytet, F. Duband, e A. Carnat, «Rosmarinic acid content and the antioxidant activity in french Lamiaceae.», *Fitoterapia*, vol. 62, pp. 166–170, 1991.

- [76] L. Slobodníková^a, S. Fialová^b, H. Hupková^a, e D. Grančai^b, «Rosmarinic Acid Interaction with Planktonic and Biofilm *Staphylococcus aureus*», *NPC Nat. Prod. Commun.*, pp. 14–17, 2013.
- [77] S. Moreno *et al.*, «Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition», *Free Radic. Res.*, 2009.
- [78] H. Cetin-karaca, «EVALUATION OF NATURAL ANTIMICROBIAL PHENOLIC COMPOUNDS AGAINST FOODBORNE», 2011.
- [79] T. S. Walker *et al.*, «*Pseudomonas aeruginosa* -Plant Root Interactions . Pathogenicity , Biofilm Formation , and Root Exudation», *Plant Physiol.*, vol. 134, pp. 320–331, 2004.
- [80] N. L. Figueiredo *et al.*, «The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability , glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*», *Food Chem.*, vol. 119, pp. 664–668, 2010.
- [81] S. O. Salawi, A. O. Ogundare, e A. A. Akindahunsi, «Antimicrobial activities of phenolic containing extracts of some tropical vegetables», *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 5, n. 4, pp. 486–492, 2011.
- [82] A. R. Gohari *et al.*, «Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*», *Eurasian J. Biosci.*, vol. 3, pp. 64–68, 2009.
- [83] F. Shahidi e M. Naczk, «Nutritional and Pharmacological Effects of Food Phenolics.», em *Phenolics in Food and Nutraceuticals.*, 2004, pp. 331–402.
- [84] S. Fialová, L. Slobodníková, L. Veizerová, e Č. Gran, «*Lycopus europaeus* : phenolic fingerprint , antioxidant activity and antimicrobial effect on clinical *Staphylococcus aureus* strains», *Nat. Prod. Res.*, n. April, pp. 37–41, 2015.
- [85] J. K. Knobloch, K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. Feucht, e D. Mack, «Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* Depends on Functional RsbU , an Activator of the sigB Operon : Differential Activation Mechanisms Due to Ethanol and Salt Stress», vol. 183, n. 8, pp. 2624–2633, 2001.
- [86] P. Steve, M. G. Surette, e F. Carlos, «Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments», vol. 4, n. February, pp. 1–14, 2013.
- [87] C. R. Arciola, D. Campoccia, S. Ravaoli, e L. Montanaro, «Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm : structural and regulatory aspects», vol. 5, n. February, pp. 1–10, 2015.
- [88] A. Abedini *et al.*, «Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit . (Lamiaceae)», *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2013.
- [89] H. Bais, T. S. Walker, H. P. Schweizer, e J. M. Vivanco, «Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*», *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 40, pp. 983–995, 2002.
- [90] K. Jiang *et al.*, «Anti-inflammatory Effects of Rosmarinic Acid in Lipopolysaccharide-Induced Mastitis in Mice», *Inflammation*, vol. 1, 2017.
- [91] M. Petersen e M. S. J. Simmonds, «Rosmarinic acid», *Phytochemistry*, vol. 62, pp. 121–125, 2003.

- [92] I. Cavalcanti, T. Menezes, L. Campos, M. Ferraz, M. Maciel, e M. Caetano, «Interaction study between vancomycin and liposomes containing natural compounds against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates», *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 54, n. 2, 2013.
- [93] T. Wadhvani *et al.*, «Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials», *Internet J. Microbiol.*, vol. 7, n. 1, 2009.
- [94] M. S. Akhtar, M. A. Hossain, e S. A. Said, «Journal of Traditional and Complementary Medicine Isolation and characterization of antimicrobial compound from the stem-bark of the traditionally used medicinal plant *Adenium obesum*», *J. Tradit. Chinese Med. Sci.*, vol. 7, n. 3, pp. 296–300, 2017.
- [95] S. P. Ekambaram, S. S. Perumal, e V. Viswanathan, «Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*», 2016.
- [96] S. B. Fialová *et al.*, «Derivatization of Rosmarinic Acid Enhances its in vitro Antitumor , Antimicrobial and», *Molecules*, vol. 24, n. 1078, 2019.
- [97] P. Neopane, R. Shrestha, O. Uehara, e Y. Abiko, «In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance», pp. 25–32, 2018.
- [98] K. R. Devi *et al.*, «In vitro and in vivo efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and virulence factor production in *Aeromonas hydrophila*», *Biofouling*, vol. 32, n. 10, pp. 1–13, 2016.
- [99] L. Slobodníková, S. Fialová, K. Rendeková, e J. Kovář, «Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols», pp. 1–15, 2016.
- [100] M. U. Amin, M. Khurram, B. Khattak, e J. Khan, «Antibiotic additive and synergistic action of rutin , morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*», pp. 1–12, 2015.
- [101] S. Sultana, A. Haque, K. Hamid, K. F. Urmi, e S. Roy, «Antimicrobial , cytotoxic and antioxidant activity of methanolic extract of *Glycyrrhiza glabra*», pp. 957–960, 2010.
- [102] M. Irani, M. Sarmadi, F. Bernard, e G. Hossein, «Leaves Antimicrobial Activity of *Glycyrrhiza glabra* L .», vol. 9, n. 8600100, pp. 425–428, 2010.