



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

Rayanne Ribeiro

Nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*): estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, mecanismos de ação e potencial como modulador de resistência aos antimicrobianos

Florianópolis

2023

Rayanne Ribeiro

Nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*): estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, mecanismos de ação e potencial como modulador de resistência aos antimicrobianos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Agroecossistemas.

Orientador(a): Prof.^a Shirley Kuhnen, Dr.^a

Coorientador(a): Luciana Aparecida Honorato, Dr.^a

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ribeiro, Rayanne

Nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*) : estudo da atividade antimicrobiana in vitro frente a *Staphylococcus aureus*, mecanismos de ação e potencial como modulador de resistência aos antimicrobianos / Rayanne Ribeiro ; orientadora, Shirley Kuhnen, coorientadora, Luciana Aparecida Honorato, 2023. 99 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Agroecossistemas. 2. nanoemulsão de macela. 3. *Achyrocline satureioides*. 4. mastite bovina. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Kuhnen, Shirley. II. Honorato, Luciana Aparecida. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.

Rayanne Ribeiro

Nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*): estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, mecanismos de ação e potencial como modulador de resistência aos antimicrobianos

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 15 de junho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Shirley Kuhnen, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Deise Baggio Ribeiro, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Maria Beatriz da Rocha Veleirinho, Dr.(a)
Nanoscopying

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Agroecossistemas pelo Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Shirley Kuhnen, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

À banca examinadora pela leitura do texto e suas considerações à pesquisa;
à professora Shirley Kuhnen pela valiosa orientação, reconhecimento e acolhimento no ambiente acadêmico;

a Luciana Honorato pela coorientação com valorosas contribuições à pesquisa;
à equipe do LABINAT pela amizade, trabalho, reuniões e muitos cafés;
a Samira Fiordalisi, amiga e técnica do LABINAT, por todo o auxílio e eficiência na resolução dos diversos empecilhos técnicos encontrados;

a Bruna, pela grande amizade construída ao longo de uma pandemia, com muita MIC, macela e cafés;

aos amigos Francisco e Antônio, pela parceria e auxílio em análises;
a João Donadio, pelo incentivo e amizade ao longo desse ciclo;
a William, pela amizade de longa data, incentivo e pela inspiração como pesquisador;

a Luiz G., Gil e Bagheera, pelo companheirismo e carinho;

a Bruna Marcon e à Plataforma de Microscopia Confocal e Eletrônica do Instituto Carlos Chagas (Fiocruz-PR) pelo processamento amostral para microscopia;

a Eliana de Medeiros Oliveira do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) pela análise microscópica;

a Carlos Alberto Kuhnen pela confecção da modelagem matemática;

à Professora Elenara Lemos do Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFSC pela cessão do homogeneizador de alta pressão para o preparo da nanoemulsão;

a Maria Beatriz Veleirinho da NanoScoping pelo preparo da nanoemulsão;

ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV), ao Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão em Agroecologia (NEPEA) e ao Laboratório de Análises - LABCAL, núcleo físico-química, que contribuíram de alguma forma para a pesquisa;

ao Programa de bolsas universitária UNIEDU/FUMDES/Pós-graduação (Chamada Pública 471/SED/2021) pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a realização desta pesquisa de mestrado.

RESUMO

Uma nova fórmula farmacêutica candidata à terapêutica da mastite bovina, *i.e.*, uma nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*) (NE-ML) (BR 10 2021 008630 0) foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa do LABINAT/UFSC. Desse modo, o objetivo deste estudo foi avançar na evolução desta nova tecnologia, investigando *in vitro* o possível mecanismo de ação antimicrobiana, o efeito antimicrobiano ao longo do tempo em diferentes condições do meio e a capacidade de interação com antimicrobianos comerciais. Para isso, a atividade antimicrobiana da NE-ML foi investigada usando diferentes metodologias, incluindo microdiluição em caldo e ensaio time-kill. A avaliação de condutividade elétrica relativa e a quantificação de materiais absorventes a 260 e 280 nm, bem como ensaios de interação com antimicrobianos também foram realizados. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da NE-ML contra a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 foram determinadas em pH 7,4, 6,0 e 5,0, sendo 5% (v/v) em pH 7,4 e 6,0, e 2,5% (v/v) em pH 5,0. Este resultado foi evidenciado com o modelo sigmoidal, que mostrou que uma menor concentração de NE-ML em pH 5,0 foi capaz de levar a diminuição de 50% da redução populacional máxima, quando comparada com as concentrações necessárias para o mesmo efeito de extermínio em pH 7,4 e 6,0. A condutividade elétrica relativa da solução bacteriana aumentou após a exposição à NE-ML em concentrações de 1 CIM e 2 CIM. O aumento da absorvância em 260 nm e 280 nm foi observado nas suspensões bacterianas expostas à NE-ML, não havendo diferença entre 2 e 4 h de exposição ($p > 0,05$). O conteúdo de proteínas totais também aumentou ($p < 0,05$) com o tempo de exposição à NE-ML. As micrografias das bactérias tratadas com NE-ML mostraram alterações na membrana plasmática e na parede celular, incluindo invaginações e áreas eletrotransparentes na região central do citosol. Com o aumento da concentração, a área eletrotransparente da região citosólica aumentou e aglomerados amorfos eletrodensos surgiram no citosol, com algumas áreas da membrana plasmática sem definição. Também ocorreu a alteração no padrão de divisão celular. A NE-ML apresentou ação na membrana plasmática, levando a alterações na permeabilização e integridade da ultraestrutura, se entendendo para parede celular, e também foram verificados danos no citoplasma celular. Além disso, o aumento da concentração da NE-ML resultou em danos mais extensos, como demonstrado pela inibição do crescimento bacteriano nos ensaios time-kill em pH 7,4 e 5,0. A modelagem matemática confirmou a atividade antimicrobiana da NE-ML em ambientes intracelulares acidificados. No entanto, quando combinada com antimicrobianos beta-lactâmicos a NE-ML apresentou interações indiferentes, indicando que sua utilização em combinação com esses compostos não é justificada. Quando em combinação com o antimicrobiano aminoglicosídeo gentamicina, apresentou resultado promissor com uma potencial interação sinérgica/aditiva contra um dos isolados bacterianos em estudo, sendo um achado importante e que necessita de maiores investigações. Os resultados encontrados nesta pesquisa são achados importantes no desenvolvimento do grau de maturidade tecnológica dessa nova fórmula farmacêutica candidata ao tratamento da mastite bovina, especialmente em sistemas de produção sustentáveis.

Palavras-chave: nanoemulsão de macela; *Achyrocline satureioides*; mastite bovina; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

A new pharmaceutical formula candidate for the therapy of bovine mastitis, *i.e.*, macela-nanoemulsion (*Achyrocline satureioides*) (NE-ML) (BR 10 2021 008630 0), was developed by the LABINAT/UFSC research group. Therefore, the objective of this study was to advance the evolution of this new technology, investigating *in vitro* the possible mechanism of antimicrobial action, the antimicrobial effect over time in different environmental conditions and the ability to interact with commercial antimicrobials. For this purpose, the antimicrobial activity of NE-ML was investigated using different methodologies, including broth microdilution and time-kill assay. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of NE-ML against the standard strain *S. aureus* ATCC 25923 were determined at pH 7.4, 6.0 and 5.0, being 5% (v/v) at pH 7.4 and 6.0, and 2.5% (v/v) at pH 5.0. This result was evidenced with the sigmoidal model, which showed that a lower concentration of NE-ML at pH 5.0 was able to lead to a 50% decrease in the maximum population reduction, when compared to the concentrations necessary for the same extermination effect at pH 7.4 and 6.0. The relative electrical conductivity of the bacterial solution increased after exposure to NE-ML at 1 MIC and 2 MIC concentrations. Increased absorbance at 260 nm and 280 nm was observed in bacterial suspensions exposed to NE-ML, with no difference between 2 and 4 hours of exposure ($p > 0.05$). The total protein content also increased ($p < 0.05$) with the exposure time to NE-ML. Micrographs of bacteria treated with NE-ML showed alterations in the plasma membrane and cell wall, including invaginations and electrotransparent areas in the central region of the cytosol. With increasing concentration, the electrotransparent area of the cytosolic region increased, and amorphous electrodense clusters appeared in the cytosol, with some areas of the plasma membrane being ill-defined. There was also a change in the pattern of cell division. NE-ML showed action in the plasmatic membrane, modifying the permeability and integrity of its ultrastructure, expanding the damage to cell wall and cytoplasm. Moreover, the increase NE-ML concentration resulted in more extensive damage, as demonstrated by the bacterial growth inhibition in time-kill assay at pH 7.0 and 5.0. Mathematical modeling confirmed the antimicrobial activity of NE-ML in acidified intracellular environments. However, when combined with beta-lactam antimicrobial, NE-ML showed indifferent interactions, indicating that its use in combination with these compounds is not justified. When combined with aminoglycoside antimicrobial, as gentamicin, it showed promising results with potential synergic/additive interaction against one of the studied bacterial isolates, being an important discovery that needs more investigation. The results found in this research are important in the development of the technological maturity level of this new pharmaceutical formula candidate for the therapy of bovine mastitis, especially in sustainable production systems.

Keywords: macela-nanoemulsion; *Achyrocline satureioides*; bovine mastitis; *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	14
3.2	MASTITE BOVINA	16
3.3	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	17
3.3.1	Patogênese da mastite bovina por <i>Staphylococcus aureus</i>.....	18
3.3.1.1	<i>Eliminação de S. aureus por fagócitos profissionais.....</i>	<i>20</i>
3.3.1.2	<i>Staphylococcus aureus intracelular e variantes de pequenas colônias (scvs)</i>	<i>22</i>
3.3.2	Fatores de virulência de <i>S. aureus</i>	24
3.4	NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA POR <i>S. AUREUS</i>	25
3.4.1	Plantas medicinais aplicadas ao tratamento da mastite bovina	26
3.4.1.1	<i>Macela – Achyrocline satureioides (Lam.) DC.</i>	<i>26</i>
3.4.2	Sistemas nanoestruturados aplicadas ao tratamento de mastite bovina	27
4	NANOEMULSÃO DE MACELA (NE-ML)	30
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	CEPAS E ISOLADOS BACTERIANOS.....	32
5.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO E DA NANOEMULSÃO DE MACELA	33
5.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NE-ML	33
5.4	CURVAS DE CRESCIMENTO E MORTE BACTERIANA	34
5.5	MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS À DINÂMICA POPULACIONAL DE CRESCIMENTO E MORTE DE <i>S. AUREUS</i>	37
5.6	EFEITO DA NE-ML SOBRE A PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR BACTERIANA	39
5.7	EFEITO DA NE-ML SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR BACTERIANA.....	39
5.8	EFEITO DA NE-ML NAS ULTRAESTRUTURAS DE <i>S. AUREUS</i>	40

5.9	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS CONTRA ISOLADOS BACTERIANOS DE <i>S. AUREUS</i>	41
5.10	MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS PELA INTERAÇÃO COM A NE-ML.....	42
5.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA NE-ML EM MEIOS COM DIFERENTES PH.....	46
6.2	CURVAS DE CRESCIMENTO E MORTE BACTERIANA.....	47
6.3	MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS À DINÂMICA POPULACIONAL DE CRESCIMENTO E MORTE DE <i>S. AUREUS</i>	52
6.3.1	pH 7,4.....	52
6.3.2	pH 6,0.....	54
6.3.3	pH 5,0.....	56
6.3.4	Análise integrada da modelagem de Gompertz e Hill nos pH 7,4; 6,0 e 5,0.....	58
6.4	ÍNDICE DE EXTINÇÃO OU DE EFEITO ANTIMICROBIANO.....	61
6.5	EFEITO DA NE-ML NA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR..	63
6.6	EFEITO DA NE-ML NA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR.....	65
6.6.1	Quantificação de proteínas totais nas suspensões bacterianas expostas à NE-ML	66
6.7	ANÁLISE DAS ULTRAESTRUTURAS DE <i>S. AUREUS</i>	67
6.8	MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS PELA INTERAÇÃO COM A NE-ML.....	75
7	CONCLUSÕES.....	80
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
	REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

A disseminação de microrganismos patogênicos resistentes a múltiplos fármacos antimicrobianos é um problema emergente, enfrentado pelos sistemas de saúde globais, no controle de um número cada vez maior de doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus, fungos e outros microrganismos (VELAZQUEZ-MEZA et al., 2022).

A resistência antimicrobiana (RAM) é considerada um fenômeno impossível de ser gerenciado ou mitigado sozinho por qualquer nação ou organização (WHO, 2015) e que, além de ser configurada como uma ameaça para a saúde pública, também gera impactos para a produção de alimentos seguros (CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2013), afeta a sanidade animal (BENGTSSON; GREKO, 2014) e agrava a contaminação ambiental (JI et al., 2012).

Instituições intergovernamentais como World Health Organization (WHO), Food and Agriculture Organization (FAO) e The World Organization for Animal Health (WOAH, fundada como OIE) desenvolvem, atualizam e difundem de forma conjunta planos de ações e estratégias baseadas em princípios One Health, para minimizar a propagação da RAM e dos seus efeitos em uma interface humano-animal-ecossistemas.

Em documento divulgado pela World Health Organization (WHO, 2017) para orientação no desenvolvimento de novos produtos e tratamentos contra patógenos resistentes à antibióticos, a organização aponta a relevância de direcionar os estudos para microrganismos de importância em saúde pública, incluindo patógenos que são rotineiramente isolados e relacionados a doenças que afetam os sistemas de produção animal como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella spp.*

As abordagens para o uso de antibióticos na medicina veterinária divergem quanto a animais de companhia e animais de produção (COLLIGNON; MCEWEN, 2019). Enquanto a conduta clínica determinada para os animais de companhia é muito semelhante à utilizada em seres humanos baseada em avaliações individuais e pontuais (VELAZQUEZ-MEZA et al., 2022), na produção animal, o uso de antibióticos não se limita a terapêutica e a profilaxia para controle de infecções bacterianas. Os antibióticos também são administrados em doses subterapêuticas em animais saudáveis como promotores de crescimento, para aumento do desempenho e da produtividade animal (OLIVEIRA et al., 2020; COLLIGNON; MCEWEN, 2019).

Se estima que as vendas globais de antimicrobianos destinados à produção animal intensiva aumentará em torno de aproximadamente 11,5% até 2030 (TISEO et al., 2019), passando de 93.309 toneladas em 2017 para 104.079 toneladas. Em 2017, os maiores

consumidores de antimicrobianos veterinários no mundo foram China (45%), Brasil (7,9%) e Estados Unidos (7%).

Os cenários endêmicos atuais estão fortemente correlacionados com o aumento do consumo de produtos para tratamento de infecções bacterianas resistentes a múltiplos medicamentos e reforçam a necessidade do desenvolvimento de novos produtos com eficácia para substituir os medicamentos convencionais utilizados rotineiramente.

O uso das plantas tem importância histórica nos processos de saúde-doença dos seres humanos e animais. As espécies vegetais se apresentam como fontes de compostos bioativos diversificados e estruturalmente complexos, com grupos funcionais altamente ativos (SIMÕES et al., 2017). Suas ações biológicas são massivamente estudadas e demonstram eficácia promissora no emprego de formulações farmacológicas potencialmente terapêuticas para os seres humanos e os animais (LEWIS; AUSUBEL, 2006), podendo fornecer novas abordagens para o uso clínico e representar uma alternativa contra os microrganismos resistentes (ANAND et al., 2019; BROWN; WRIGHT, 2016).

Neste sentido, uma nanoemulsão de macela (NE-ML) foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa do LABINAT-UFSC (PINHEIRO MACHADO et al., 2020; PINHEIRO MACHADO, 2021), como um produto alternativo para o controle de mastite bovina. Esta nanoformulação contendo o extrato bruto de macela (*Achyrocline satureioides*) foi incorporada em um veículo de liberação gradual com polímeros naturais e gerou o pedido de registro de patente BR 10 2021 008630 0. Foi demonstrado que a NE-ML apresentou boa ação antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, com capacidade de prevenção e erradicação de biofilmes formados por bactérias planctônicas, efeito citoprotetor para células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) e alta capacidade de penetração na glândula mamária em um modelo de células de Franz. Além disso, quando a nanoemulsão de macela foi incorporada em nanocompósitos a base de polímeros naturais (mucilagem de linhaça e k-carragenana) mostrou liberação prolongada dos seus compostos bioativos (PINHEIRO MACHADO et al., 2022; PINHEIRO MACHADO, 2021). A invenção BR 10 2021 008630 0, portanto, se refere a uma nanoemulsão do óleo vegetal de linhaça, *Linum usitatissimum* L., contendo extrato de macela (*Achyrocline satureioides*) para uso como antimicrobiano na área veterinária e saúde animal. No mesmo pedido, reivindica-se também o reconhecimento da invenção de um gel bioativo de k-carragenana e mucilagem de linhaça (nanocompósito) com viscosidade, velocidade de degradação e liberação dos ativos adequada para a liberação gradativa dos ativos antimicrobianos da nanoemulsão de macela incorporada neste material, visando sua aplicação em veterinária. Os resultados obtidos com os estudos *in vitro* do

invento BR 10 2021 008630 0 são achados muito importantes para a prevenção e tratamento de mastite bovina causada por *S. aureus*, justificando a necessidade de estudos visando o gerenciamento de incertezas relacionadas a viabilidade desta tecnologia.

Deste modo, o presente trabalho se propôs a gerenciar algumas das incertezas relativas à tecnologia BR 10 2021 008630 0, *i.e.*, nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*), tais como buscar compreender os possíveis mecanismos farmacológicos e das diferentes interações desencadeadas no organismo, em resposta à administração da NE-ML e seu efeito terapêutico desejado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avançar no desenvolvimento tecnológico da nanoemulsão de macela (NE-ML) (BR 10 2021 008630 0) para compreensão de mecanismos farmacodinâmicos, de ação frente a *S. aureus* e de modulação da resistência antimicrobiana através de testes *in vitro*

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da NE-ML frente a *S. aureus* ATCC 25923 em pH 7,4; 6,0 e 5,0.
- Determinar as curvas de crescimento e morte de *S. aureus* ATCC 25923 após exposição à NE-ML, ao longo do tempo, em pH 7,4; 6,0 e 5,0.
- Avaliar o comportamento da dinâmica populacional de *S. aureus* ATCC 25923 em contato com a NE-ML, ao longo do tempo, nos pHs 7,4; 6,0 e 5,0, usando modelos matemáticos.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da NE-ML sobre a permeabilidade e integridade da membrana plasmática de *S. aureus* ATCC 25923.
- Analisar a ultraestrutura bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923 após exposição à NE-ML.
- Investigar a capacidade modulatória da NE-ML quando associada com antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos frente às cepas padrão *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 33592 e isolados bacterianos de leite mastítico (bacterioteca LABINAT/CCA/UFSC - O1, P1, P2, G1 e G2).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Os antibióticos são considerados uma das principais descobertas na história da ciência moderna (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019), revolucionando a clínica médica mundial. A alta dependência destas moléculas para tratamento de diferentes enfermidades e o aumento da interação entre a interface seres humanos - animais - meio ambiente levou ao desenvolvimento de um número crescente de microrganismos resistentes de grande impacto nos sistemas de saúde, com altas taxas de mortalidade e morbidade, com tratamentos prolongados e de alto custo (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

Em relatório divulgado pelo The Lancet em 2019 (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022), aproximadamente 1,27 milhões de mortes foram atribuídas à resistência antimicrobiana e outras 4,95 milhões de mortes foram associadas à resistência antimicrobiana.

Apesar dos fatores de resistência ocorrerem de forma natural nas bactérias, a alta dependência, uso exacerbado e equivocado de concentrações, tempo e especificidade dos antibióticos também contribuem significativamente para o surgimento da resistência antimicrobiana (MARSTON et al., 2016). A disseminação de resistência antimicrobiana entre diferentes populações e ecossistemas é altamente favorecida por tais práticas, pois aumentam a exposição dos microrganismos a ambientes que forcem uma pressão de seleção pelo uso de antibióticos (KOLÁŘ; URBÁNEK; LÁTAL, 2001).

Nestes ambientes, as bactérias passam a desenvolver rápidas alterações genômicas e fenotípicas, resultando na expressão de mecanismos de resistência aos antibióticos, contribuindo para o surgimento e evolução de cepas multirresistentes (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Ao serem expressos, esses mecanismos de resistência podem resultar na (a) alteração da permeabilidade da membrana celular, levando a diminuição do acúmulo intracelular do fármaco, (b) no efluxo ativo de moléculas de antibióticos (KUMAR; SCHWEIZER, 2005), (c) na modificação do local-alvo do antibiótico por mutação ou modificação enzimática (LAMBERT, 2005) e (d) em mecanismos enzimáticos de degradação e inativação de antibióticos (WRIGHT, 2005).

Os genes que regulam a expressão destes mecanismos nas bactérias podem ser transferidos entre bactérias de uma mesma linhagem de descendentes por transferência vertical de genes ou pode ocorrer por trocas horizontais de elementos gênicos móveis como

plasmídeos e transposons, entre bactérias de espécies e gêneros distintos (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

A velocidade com que as bactérias passaram a desenvolver resistência aos antibióticos não acompanhou a velocidade de desenvolvimento e descoberta de novos agentes antimicrobianos (GOLD; MOELLERING, 1996). O primeiro antibiótico a ser incluído na prática clínica no ano de 1940 foi a penicilina, e já em 1942 ocorre o relato de estafilococos resistentes à penicilina, marcando a primeira onda de resistência aos antibióticos (LOWY, 2003). A meticilina, um antibiótico beta-lactâmico semissintético, foi desenvolvido para combater a disseminação da resistência à penicilina, mas logo após a sua introdução clínica em 1960, foram descritos os primeiros casos de *S. aureus* resistentes a todos antibióticos beta-lactâmicos (WATKINS; HOLUBAR; DAVID, 2019).

Essas variantes de *S. aureus* resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos como a oxacilina, a penicilina e a amoxicilina, ficaram conhecidas como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e surgem em condições ou locais específicos (MLYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2022).

Patógenos resistentes à antibióticos vêm sendo caracterizados com base em suas sequências genéticas e são continuamente monitorados para verificação de novas alterações, permitindo a comparação de dados em diferentes localidades. Através do sequenciamento genômico (SPOOR et al., 2013), mostrou-se que clones emergentes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina associadas à comunidade (CA-MRSA) epidêmicos humanos, se originaram em virtude de um salto de hospedeiros bovinos para humanos. A resistência à meticilina destes clones humanos de *S. aureus* coincidiu com a aquisição independente de elementos genéticos móveis, responsáveis pela codificação da resistência antimicrobiana.

Em 2005, na Europa, foi relatada uma nova cepa MRSA em suínos e suinocultores (VOSS et al., 2005; ANJUM et al., 2019). Ela passou a ser denominada como MRSA associada a pecuária (LA-MRSA) identificada como ST398 e cepas relacionadas foram agrupadas e identificadas como CC398 (complexo clonal 398). A capacidade adaptativa de LA-MRSA representa ser significativamente alta e já é considerada uma categoria emergente no cenário de resistência antimicrobiana. LA-MRSA CC398 passou a ser identificada em seres humanos, animais de companhia e animais de produção, de forma crescente e em vários locais do mundo (SMITH, 2015).

Portanto, os animais de produção representam um importante reservatório de novas cepas de *S. aureus* com potencial patogênico e com capacidade de propagação pandêmica. A associação de *S. aureus* como patógeno de infecções em animais de produção é comumente

relatada em bovinos leiteiros, especialmente como agente etiológico de mastite bovina (AIRES-DE-SOUSA, 2016; KADLEC et al., 2012).

Os antimicrobianos são medicamentos essenciais e priorizar o controle da disseminação e prevalência da resistência antimicrobiana por meio de uma abordagem colaborativa, transdisciplinar e multissetorial, pode alterar os cenários de alto impacto econômico, social e ambiental previstos para as gerações futuras (COLLIGNON et al., 2018; COLLIGNON, 2012).

3.2 MASTITE BOVINA

A mastite bovina é a doença mais comum que afeta o gado leiteiro, sendo responsável por grandes perdas econômicas no setor produtivo. Seu custo é subestimado, pois seu desenvolvimento clínico é marcado pela cronicidade e os danos financeiros são distribuídos ao longo do tempo (HOGEVEEN; HUIJPS; LAM, 2011). As perdas econômicas no campo são correlacionadas à diminuição da produção e qualidade do leite, ao descarte de leite com resíduos de antibióticos, à perda de lactação e à interferência nos problemas de saúde que influenciam o bem-estar animal (JAVED et al., 2022).

A mastite bovina é uma doença multifatorial caracterizada pela inflamação da glândula mamária bovina em resposta à irritação química, às alergias, ao dano físico e à infecção por microrganismos (EZZAT et al., 2014). Lesões físicas no teto aumentam a vulnerabilidade do úbere e propiciam uma maior chance de invasão, colonização e infecção bacteriana que podem convergir para o desenvolvimento de uma infecção intramamária (ASHRAF; IMRAN, 2021).

Alterações fisiológicas e metabólicas de forma local e sistêmica no animal como dor, vermelhidão, inchaço, diminuição do apetite, diminuição na produção e alteração das características visuais do leite marcam o quadro de mastite clínica. A mastite subclínica é caracterizada pela alteração na constituição do leite com o aumento da contagem de células somáticas, sem a presença da sintomatologia clínica sistêmica e local (RADOSTITS et al, 2007).

A glândula mamária é composta por estruturas anatômicas que desempenham um mecanismo de defesa física contra a penetração de patógenos. Esse mecanismo é desempenhado pelo esfíncter de músculo liso que envolve o canal do teto, responsável por sua abertura e fechamento eficientes. Os constituintes da pele do teto, como ácidos graxos e

queratina que revestem o canal, garantem a defesa química por apresentarem atividade antimicrobiana (EZZAT et al., 2014).

Quando as proteções física e química são ineficientes, bactérias ambientais como *Streptococcus uberis*, *Enterococci*, *Escherichia coli* e *Actinomyces pyogenes* podem desencadear uma infecção intramamária. Animais doentes e infectados por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* também podem contaminar outros animais do rebanho que apresentem problemas com suas barreiras físicas e químicas (GOMES; HENRIQUES, 2016).

Fatores genéticos, fisiológicos e ambientais podem aumentar os casos de mastite no rebanho. Mudanças na glândula mamária ao longo dos diferentes períodos da lactação contribuem para o aumento do estresse metabólico sofrido pelo animal. Nos períodos de transição que envolvem a secagem e o parto, ocorre a diminuição da imunidade e o aumento da vulnerabilidade dos animais durante esses períodos (SORDILLO, 2005).

Staphylococcus aureus é o principal patógeno associado a casos de mastite crônica e subclínica na pecuária leiteira, considerado um agente etiológico contagioso (FITZGERALD, 2012). É comum que a doença se prolifere durante a ordenha, sendo transmitida de um animal a outro quando há uma higienização precária dos equipamentos pelos manipuladores, bem como pelo manejo equivocado dos animais doentes na linha de ordenha (JONES; BAILEY; ROBERSON, 2010).

3.3 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica (MORIKAWA et al., 2012), colonizadora natural ou residente da pele e mucosa de humanos, outros mamíferos e aves. É o principal patógeno associado a infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade. Pode ocasionar diferentes doenças infecciosas de importância na medicina humana e veterinária, que vão de problemas cutâneos a infecções sistêmicas potencialmente fatais (PANTOSTI, 2012).

Descrito pelo cirurgião escocês Sir Alexander Ogston, em 1880, através da observação microscópica de abscessos humanos, foi relatado como micrococos esféricos parecidos com cachos de uva e nomeado como *Staphylococcus* (do grego *staphylé*, cacho de uvas, e *kókkos*, baga). Foi diferenciada em *S. aureus* (do latim, ouro) e *S. albus* (do latim, branco) pelo médico alemão Friedrich Julius Rosenbach (MYLES; DATTA, 2012).

São cocos gram-positivos que crescem em grupos, pares e cadeias curtas em formato de cacho de uva, catalase-positiva, oxidase-negativa, anaeróbia facultativa, coagulase positiva ou negativa, imóvel e não formadora de esporos (KAYILI; SANLIBABA, 2020).

S. aureus contém fragmentos de DNA conhecidos como elementos genéticos móveis (MGEs) como plasmídeos, transposons, sequências de inserção, ilhas de patogenicidade e cassete cromossômico estafilocócico *mec*. São responsáveis pela codificação de diferentes determinantes de virulência e resistência, incluindo enzimas que medeiam sua própria transferência e integração com outro DNA (BURMEISTER, 2015).

MGEs são considerados os principais agentes de transferência horizontal de genes (HGT) (FROST et al., 2005) e isso tem forte influência na evolução dos mecanismos adaptativos da bactéria a toxinas, antibióticos e outros fármacos que são associados ao desenvolvimento e aquisição de fatores de virulência, como secreção de enzima, proteínas, toxinas *etc.* (MORIKAWA et al., 2012).

3.3.1 Patogênese da mastite bovina por *Staphylococcus aureus*

S. aureus é considerado um patógeno adaptativo e oportunista que se dissemina entre os bovinos durante a ordenha (CAMPOS et al., 2022). Ao ultrapassar as barreiras anatômicas da glândula mamária como o esfíncter do teto e as superfícies enzimáticas e mucoides, as bactérias estafilocócicas adentram na glândula mamária pelo canal do teto (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). O sistema imune inato mediado principalmente por células leucocitárias, é rapidamente ativado assim que o organismo animal é exposto às bactérias, desencadeando uma resposta imunológica (TURVEY; BROIDE, 2010).

O deslocamento de *S. aureus* pela glândula mamária estimula monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e epiteliais a secretar mediadores inflamatórios e substâncias quimioatraentes. Essas moléculas se ligam e envolvem receptores de superfície específicos no levantamento de neutrófilos, que também podem ser recrutados de forma direta por alguns produtos derivados das bactérias (RIGBY; DELEO, 2012).

O comprometimento tecidual e a migração das células leucocitárias também desencadeiam a liberação e a produção de substâncias envolvidas na ativação do Sistema Complemento, que é composto por proteínas presentes no sangue ou associadas à membrana. Quando ativadas culminam em reações enzimáticas sequenciais e produtoras de substância imunoligantes ativas (*e.g.* anafilotoxinas C3a e C5a), que agem como moléculas

quimioatraentes para fagócitos do sangue (neutrófilos e monócitos) até o local da lesão e inflamação, responsáveis por iniciar a resposta inflamatória (DELVES; ROITT, 2000; SARMA; WARD, 2011).

Os neutrófilos que reconhecem estes sinais saem da circulação por extravasamento pela parede endotelial e seguem até o local da infecção por quimiotaxia. A ativação de neutrófilos que desencadeia o processo de fagocitose e requer concentrações de ligante/estímulo muito maiores do que as concentrações necessárias para a quimiotaxia (HAXHIAJ; WISHART; AMETAJ, 2022).

Para evadir da ação do sistema imune e da fagocitose, *S. aureus* serve-se de mecanismos que facilitam sua adesão e invasão/internalização às células epiteliais mamárias bovinas e a outros tecidos do hospedeiro (BROUILLETTE; TALBOT; MALOUIN, 2003; ALEXANDER; HUDSON, 2001).

S. aureus produz adesinas da família MSCRAMMs (componente de superfície microbiana que reconhece moléculas de matriz adesiva) e as utiliza para aderir diretamente às células hospedeiras. Também pode se aderir às células hospedeiras por meio de pontes ligantes (SENDI; PROCTOR, 2009). Algumas proteínas de ligação ao fibrinogênio produzidas por *S. aureus*, como os fatores de agregação A e B (ClfA e ClfB) também atuam como adesinas (CAMPOS et al., 2022).

As MSCRAMMs são ancoradas na parede celular bacteriana e tem capacidade de ligação à matriz extracelular (MEC), às células hospedeiras ou às proteínas plasmáticas do hospedeiro (CAMPOS et al., 2022). Geralmente se ligam de forma covalente ao peptidoglicano da parede celular e tem capacidade de reconhecimento e ligação com fibronectina, fibrinogênio, colágeno, elastina e laminina (ZUNIGA et al., 2015). São cruciais no processo de invasão/internalização das células hospedeiras e na formação de biofilme (JOSSE; LAURENT; DIOT, 2017).

A proteína de ligação à fibronectina (FnBPA) é um exemplo de adesina produzida por *S. aureus* que tem a capacidade de se ligar à fibronectina da matriz extracelular (MEC), e de aderência ao fibrinogênio, elastina e plasminogênio, facilitando a promoção da colonização de diferentes tecidos e de disseminação para outros locais.

Outra proteína multifuncional secretada por *S. aureus* é a proteína de adesão extracelular (EAP) de alta capacidade de ligação às células epiteliais (HUSSAIN et al., 2002). EAP se liga a outras moléculas de EAP por afinidade, colaborando com o processo de adesão e agregação bacteriana. Sua expressão é modulada pelo ferro, e em condições de restrição de

ferro, a formação de biofilmes depende de EAP (THOMPSON; ABRAHAM; JEFFERSON, 2010).

A fibronectina da matriz extracelular age como uma ponte de ligação entre as adesinas/proteínas produzidas por *S. aureus* e integrinas presentes na superfície celular do hospedeiro. Essa ligação induz a modulação do rearranjo de citoesqueletos para a formação de estruturas semelhantes a pseudópodes, que medeiam a absorção bacteriana e forçam sua fagocitose por células que não são naturalmente fagocíticas, como as células epiteliais (CAMPOS et al., 2022)

S. aureus se adapta a este ambiente intracelular com novas estratégias para sobreviver às defesas citoplasmáticas nas células do hospedeiro através de mecanismos como: (a) diminuição da produção de suas toxinas α -toxina e TSST-1, evitando danos às células hospedeiras, (b) aumento da secreção de adesinas como a adesina polissacarídica extracelular (PIA) e diminuição do seu potencial de membrana para sobreviver ao ataque de proteínas catiônicas produzidas pela célula hospedeira (SENDI; PROCTOR, 2009) e (c) capacidade de proliferação em compartimentos celulares como endossomo e citosol de fagócitos não profissionais como queratinócitos e células endoteliais, a fim de estabelecer um reservatório (ALGHARIB; DAWOOD; XIE, 2020).

Algumas adesinas como as FnBPs e Eap também se comportam como invasinas, responsáveis pela internalização do patógeno bacteriano nas células endoteliais e epiteliais do hospedeiro (SINHA; FRAUNHOLZ, 2010). A internalização de *S. aureus* pode fornecer proteção contra componentes do sistema imune inato e adquirido do hospedeiro, além de proporcionar proteção contra a ação de alguns antibióticos (ALEXANDER; HUDSON, 2001).

3.3.1.1 *Eliminação de S. aureus por fagócitos profissionais*

As bactérias que foram sinalizadas com imunoglobulinas específicas ou por componentes do sistema complemento serão reconhecidas por receptores específicos nos fagócitos profissionais (WAGNER; FRANK, 2010). Isso orienta e ativa as vias que regulam o citoesqueleto de actina (RASHIDFARROKHI; RICHINA; TAFESSE, 2017), possibilitando que o fagócito envolva a bactéria a partir da produção de saliências necessária para a internalização de *S. aureus* e sua eliminação.

O fagossomo é uma vesícula destacada da membrana plasmática (ROSALES; URIBE-QUEROL, 2017), como um compartimento isolado, que permite a secreção de agentes tóxicos no patógeno e restringe suas fontes de nutrientes (RIGBY; DELEO, 2012).

A maturação dessa estrutura ocorre de forma gradual, quando a vesícula muda sua composição da membrana através da fusão com vesículas secretoras e grânulos (RIGBY; DELEO, 2012). O fagolisossomo, assim chamado, passa a ter seu conteúdo e ambiente do lúmen modificados, com acidificação do ambiente, explosão oxidativa, e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (VAN KESSEL; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014).

As ROS causam danos oxidativos ao interagir com componentes celulares como DNA, lipídios e proteínas. São secretadas por oxidases Nox e Duox NADPH, que catalisam a produção de superóxido (O_2^-) e geram peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente (BAYR, 2005).

A eliminação de *S. aureus* pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e pela degranulação de proteases e peptídeos antimicrobianos pode ser evitada após sua internalização (VAN KESSEL; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014). As bactérias estafilocócicas podem sobreviver dentro dos fagossomos através da (i) secreção de enzimas citolíticas para lisar os neutrófilos; (ii) inibição das espécies reativas de oxigênio (ROS); ou por (iii) alteração da carga da membrana celular bacteriana dentro dos fagossomos.

S. aureus pode secretar modulinas solúveis em fenol (PSMs), reguladas pelo gene acessório *Agr*, comumente associado com a inibição da maturação dos biofilmes (CHATTERJEE; OTTO, 2013). Estas moléculas são inibidas por lipoproteínas séricas do hospedeiro, mas em ambientes intracelulares passam a ter efeito citolítico. Assim, se ao ser internalizado por um neutrófilo, a bactéria pode secretar peptídeos como PSM α dentro do fagossomo e o neutrófilo será lisado, levando a sobrevivência e fuga da bactéria (OTTO, 2014).

A bactéria *S. aureus* é capaz de expressar (i) duas superóxidos dismutases (SodA e SodM) com capacidade de conversão do ânion superóxido O_2^- em H_2O_2 e O_2 ; (ii) uma catalase desintoxicante de H_2O_2 (KatA) e uma alquil hidroperóxido redutase (AhpC), responsáveis por extinguir altas e baixas concentrações de H_2O_2 ; (iii) duas glutionas peroxidases (GpxA1 e GpxA2) catalisadoras da redução de H_2O_2 em H_2O , pela oxidação da glutationa (GSH) (RAMOND et al., 2021), e (iv) produzir estafilocoxantina, um pigmento carotenoide triterpenoide de cor amarelada a alaranjada, com capacidade antioxidante pela presença de uma longa cadeia de carbonos centrais em seu esqueleto com ligações duplas conjugadas, que

são as responsáveis pela absorção do excesso de energia produzida pelas ROS (e.g. O_2^- , H_2O_2 e $HClO$) (XUE et al., 2019).

S. aureus também pode apresentar um sistema sensor de peptídeo antimicrobiano (aps) e que, quando ativado, induz à expressão do gene *mprF* e do operon *dlt*. O gene *mprF* é responsável pela adição de resíduos L-lisina aos fosfatidilgliceróis expostos na face externa da membrana citoplasmática que reduzem sua carga elétrica. O operon *dlt* é capaz de incorporar D-alanina nas moléculas como ácidos teicóicos da parede, ácidos lipoteicóicos e fosfolípidios de membrana bacteriana, neutralizando a carga líquida negativa da sua membrana celular. Essa mudança evita a afinidade por peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) que possuem carga líquida positiva, presente dentro dos grânulos fagocíticos (JOO; OTTO, 2015).

Os neutrófilos contribuem para a resolução da inflamação e envolvem a regulação dos macrófagos em respostas imunes a longo prazo (ROSALES, 2018). Após a fagocitose, os neutrófilos morrem por apoptose, mantendo a integridade da membrana para evitar a liberação do conteúdo citotóxico. Neutrófilos apoptóticos são reconhecidos e ingeridos por macrófagos, sem que haja consequências ao organismo. Esse processo também estimula a renovação celular e manutenção homeostática no hospedeiro (RIGBY; DELEO, 2012).

Algumas bactérias de *S. aureus* não serão exterminadas pela ação do fagolisossomo, conseguindo sobreviver dentro dos fagócitos profissionais e não profissionais, e.g., células endoteliais (FRAUNHOLZ; SINHA, 2012). Esta capacidade é correlacionada às células bacterianas conhecidas como variantes de pequenas colônias (SCVs) de *S. aureus*.

3.3.1.2 *Staphylococcus aureus* intracelular e variantes de pequenas colônias (scvs)

S. aureus também é considerado um patógeno intracelular facultativo e pode se propagar e persistir de diferentes maneiras no hospedeiro (ENGLER et al., 2022). Geralmente são subpopulações de bactérias conhecidas como variantes de pequenas colônias (SCVs), que desenvolveram a capacidade adaptativa de sobrevivência no meio intracelular (SENDI; PROCTOR, 2009).

Ao crescerem no citoplasma das células hospedeiras, as bactérias ficam protegidas do sistema imune dos hospedeiros (sistema complemento e anticorpos) e da ação de antibióticos, que possui baixa penetração nas células eucarióticas (ALGHARIB; DAWOOD; XIE, 2020).

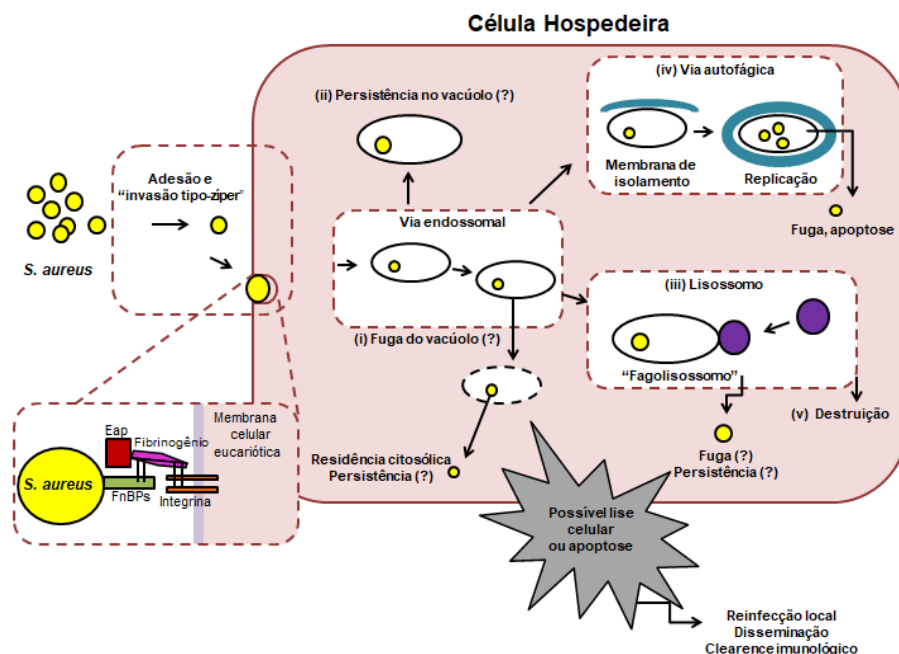
As SCVs são fenotipicamente diferentes, podem ter um décimo do tamanho normal de *S. aureus*, alteração da pigmentação, taxa de crescimento lenta, morfologia de colônia atípica e características bioquímicas incomuns, como hemólise e resistência aumentada a aminoglicosídeos (LOSS et al., 2019). Algumas alterações genéticas em SVCs são relacionadas a auxotrofas, como menadiona, hemina ou timidina (SENDI; PROCTOR, 2009; PROCTOR; VON EIFF; KAHL, 2006).

Para que ocorra a sobrevivência intracelular em fagócitos não profissionais, a adesão de *S. aureus* às células hospedeiras é crucial no seu processo de invasão que é mediado por integrinas, entre as células eucarióticas e a matriz extracelular (MEC).

As variantes de pequenas colônias tendem a expressar de forma exacerbada o fator de agregação de ligação ao fibrinogênio (ClfA) e proteínas de ligação à fibronectina (FnBPs), responsáveis por garantir ligações eficientes às células eucarióticas (SENDI; PROCTOR, 2009).

Em células fagocíticas não profissionais, a adesão é dependente de FnBPs-fibronectina-integrinas e a entrada bacteriana se dá pelo mecanismo tipo zíper (GARZONI; KELLEY, 2009). Após seu engolfamento, *S. aureus* se adapta com novas estratégias para sobreviver no ambiente intracelular (figura 1) (ALGHARIB; DAWOOD; XIE, 2020).

Figura 1 Estratégias de sobrevivência intracelular de *S. aureus* em células fagocíticas não profissionais.



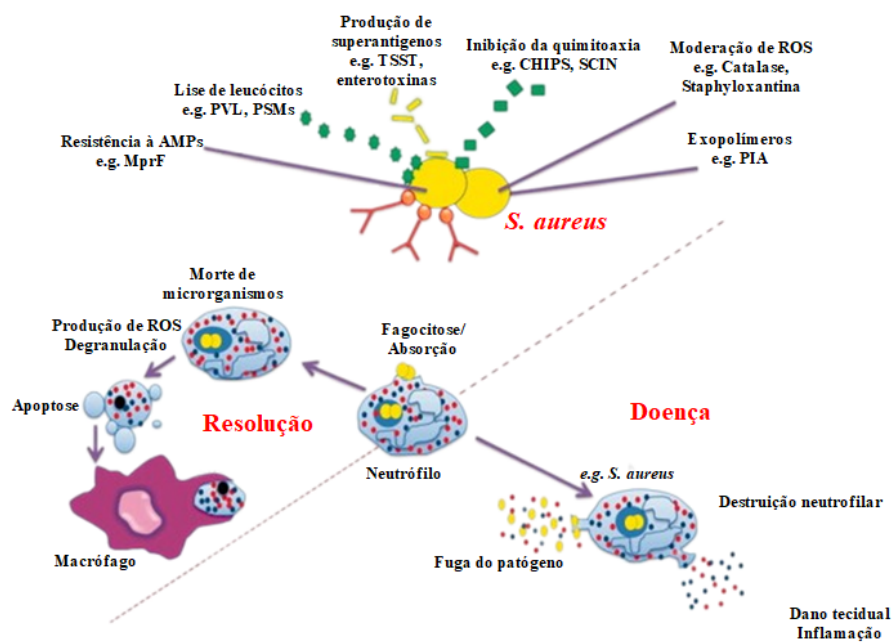
Fonte: Adaptado de Garzoni; Kelley (2009).

Hipóteses são apontadas sobre os mecanismos de sobrevivência intracelular de *S. aureus* através da (i) fuga do compartimento endossomal; (ii) persistência dentro de vacúolos; (iii) sobrevivência dentro do compartimento lisossômico; (iv) envolvimento por organelas autofágicas de membrana dupla (membranas de isolamento) e (v) destruição (GARZONI; KELLEY, 2009).

3.3.2 Fatores de virulência de *S. aureus*

S. aureus pode expressar uma variedade de fatores de virulência (figura 2) que incluem um número considerável de toxinas, fatores proteicos e não proteicos que permitem sua evasão do sistema imunológico do hospedeiro, sua sobrevivência intracelular e a manutenção da infecção (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

Figura 2 Fatores de virulência de *S. aureus*.



Fonte: Adaptado de Algharib; Dawood; Xie (2020).

Dentre os mecanismos de virulência associados aos casos de mastite bovina crônicos ou recorrentes, a formação de biofilmes é citada como uma das mais preocupantes. Os biofilmes são agregados celulares bacterianos envoltos em uma matriz polimérica extracelular que se auto sintetiza, onde as bactérias podem permanecer adormecidas e com diminuição da sua atividade metabólica (VESTBY et al., 2020).

Os biofilmes permitem a sobrevivência das bactérias no hospedeiro e reduzem a suscetibilidade à terapia antimicrobiana, devido à baixa difusão de fármacos através da matriz do biofilme (AMORENA et al., 1999).

A capacidade de secretar toxinas é outro importante mecanismo de virulência associado a *S. aureus*. Exotoxinas desempenham importante papel nas infecções de pele, incluindo a mastite bovina (ABRIL et al., 2020) e podem ser agrupadas em três categorias de acordo com suas funções (1) superantígenos, (2) enzimas citotóxicas e (3) citotoxinas (TAM; TORRES, 2019).

A expressão e secreção de proteínas que impedem sua ligação e reconhecimento por receptores leucocitários e conseqüentemente a ativação do sistema imunológico, desempenham um papel antifagocítico importante (OTTO, 2014). As mais famosas são a proteína estafilocócica inibidora do complemento (SCIN), proteína de aderência extracelular (EAP), adesinas como a Coagulase (Coa) e a proteína extracelular de ligação ao fibrinogênio (Efb) (WOEHL et al., 2014; ROOIJAKKERS et al., 2005).

Algumas cepas de *S. aureus* expressam uma cápsula de polissacarídeo que recobre sua parede celular, tornando sua superfície antigênica inacessível à ligação de fatores do sistema complemento e a outras moléculas responsáveis pelo mecanismo de opsonização e ligação aos receptores dos neutrófilos (SANTOS et al., 2007).

3.4 NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS PARA TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA POR *S. AUREUS*

A formação de biofilme, a formação de variantes de pequena colônia (SCVs), a capacidade de sobreviver dentro de neutrófilos e a capacidade de invasão de células epiteliais mamárias (ALGHARIB; DAWOOD; XIE, 2020) são alguns dos fatores apontados como causa de tratamentos insatisfatórios de mastite bovina causada por *S. aureus*.

A antibioticoterapia ainda é a principal estratégia para tratamento de infecções intramamárias, mas seu sucesso depende de um conjunto de fatores do hospedeiro animal (fase de lactação, manifestação clínica, paridade, quartos afetados, contagem de células somáticas), fatores bacterianos e regime de tratamento (várias classes de compostos antimicrobianos, combinações de fármacos, vias de aplicação e duração de tratamento) (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006).

A característica de transmissão contagiosa de *S. aureus* expõe muitos animais do rebanho ao risco de infecções intramamárias. Além disso, a possibilidade de cura para casos

de mastite subclínica durante a lactação pode ter uma variação muito ampla (de 5% até mais de 80%) (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006), levando a incertezas do benefício do tratamento do ponto de vista econômico (SALAT et al., 2008).

Novas modalidades de tratamento vêm sendo pesquisadas como alternativa ao insucesso obtido com a antibioticoterapia da mastite bovina por *S. aureus*. A terapia fágica (VARELA-ORTIZ et al., 2018), endolisinas fágicas (FENTON et al., 2013), vacinas (RAINARD et al., 2021), abordagens probióticas (WALLIS; KRÖMKER; PADUCH, 2018), fitoterápicos (AVANCINI et al., 2008) e nanopartículas (ELBEHIRY et al., 2019) são descritos como ferramentas para o controle de mastite bovina estafilocócica.

3.4.1 Plantas medicinais aplicadas ao tratamento da mastite bovina

O surgimento e disseminação das diferentes cepas bacterianas multirresistentes forçam a reavaliação da importância das plantas como alternativas farmacológicas para o tratamento de enfermidades. É importante denotar a necessidade de investimento em pesquisas e na captação de dados científicos para validação de suas ações farmacológicas *in vitro* que assegurem produtos com baixa toxicidade, alta estabilidade e desempenho farmacocinético (MOLONEY, 2016).

O uso de espécies vegetais na formulação de medicamentos e produtos voltados para a produção animal são consideradas alternativas promissoras aos crescentes problemas de resíduos farmacológicos na produção animal, contaminação ambiental e a resistência antimicrobiana. A *Achyrocline satureioides* vem sendo investigada (PINHEIRO MACHADO et al., 2022, PINHEIRO MACHADO et al., 2020; FIORDALISI, 2018; BOTH et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; SPEROTTO et al., 2012) com ação antimicrobiana contra microrganismos causadores de mastite bovina, tendo possibilidade de incorporação em biotecnologias para emprego na terapêutica da doença, para atuar e intervir nos problemas crescentes na produção animal.

3.4.1.1 Macela – *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

Achyrocline satureioides (Lam.) DC., família Asteraceae (*Compositae*), é uma erva medicinal, popularmente conhecida como macela, macelinha, macela do campo, marcela (Brasil), eloyatei-caá (Tupi-guarani), macela hembra (Argentina e Uruguai). Planta nativa da

América do Sul, possui ocorrência no sul, sudeste e nordeste do Brasil e nos países da Argentina, Uruguai e Paraguai (GARLET, 2019; LORENZO et al., 2000; RUFFA et al., 2002).

A planta foi descrita pela primeira vez em 1788 na *Encyclopédie Methodique: Botanique*, com o nome de *Gnaphalium satureioides* Lam., pelo botânico francês Jean Baptiste Pierre Antoine de Monet, Chevalier de Lamarck (1744-1829). Foi listada como *Achyrocline satureioides* pelo botânico Augustin Pyrame De Candolle (1788-1841) no *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* (1837) (GONÇALVES; FERREIRA; MING, 2018).

Os flavonoides e os polifenóis são os principais compostos identificados e isolados das partes aéreas e inflorescências da planta. Os teores mais expressivos encontrados na espécie são dos compostos quercetina (QCT), luteolina (LUT) e 3-O-metilquercetina (3OMQ) (MARTÍNEZ-BUSI et al., 2019; SOUZA, et al., 2018; BIANCHI et al., 2018; JORAY; MORESCO et al., 2017; PALACIOS; CARPINELLA, 2013; PETROVICK; PETROVICK; BASSANI, 2010; SIMÕES et al., 1988).

A achyrobichalcona (ACB) foi recentemente identificada (HOLZSCHUH et al., 2010) na espécie. Possui estrutura química semelhante a outras bichalconas bioativas. As chalconas são precursores biossintéticos de flavonoides (BIANCHI et al., 2018).

Também já foram identificados ácido caféico, ácido clorogênico, ácido elágico, ácido gálico, alfa-humuleno, ácido 3,4-di-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, cariofileno, catequina, epicatequina, isômeros de ácido dicafeoilquínico, isoquercitrina, kaempferol, rutina, 23-metil-6-O-desmetilauricepirona e trans-cariofileno (MACHADO et al., 2020; MARTÍNEZ-BUSI et al., 2019; GOLTZ et al., 2018; HATAMI et al., 2012; GILLIJ; GLEISER; ZYGADLO, 2008).

Algumas atividades biológicas associadas a *A. satureioides* como antimicrobiana (TONELLO et al., 2022), antioxidante (GONZÁLEZ et al., 2022), anti-inflamatória (DE SOUZA; BASSANI; SCHAPOVAL, 2007), anticancerígena (SOUZA et al. 2018), e ação acaricida e anti-helmíntica (FANTATTO et al., 2022) são relacionadas a ação dos compostos flavonoides na sua composição.

3.4.2 Sistemas nanoestruturados aplicadas ao tratamento de mastite bovina

A nanotecnologia vem despontando como uma ferramenta na medicina veterinária, proporcionando a criação e manipulação de produtos, materiais e estruturas de dimensões

nanométricas aplicáveis em todos os setores da cadeia produtiva, desde a genômica animal aos produtos de origem animal (SCOTT, 2007).

Sistemas de entregas de medicamentos baseados em nanotecnologia como as nanopartículas, são consideradas sistemas ideais por possuírem tamanho nanométrico e controlável, alta zona de superfície e reatividade (YOUSSEF et al., 2019) e maior propensão a penetração celular do que micropartículas (SANKAR, 2016).

Os extratos de espécies vegetais podem ser incorporados nesses sistemas nanocarreadores para entregar compostos, levando ao aumentando da sua estabilidade, biodisponibilidade, vida útil e especificidade ao tecido alvo, além da diminuição da toxicidade (YOUSSEF et al., 2019; HARWANSH; DESHMUKH; RAHMAN, 2019).

As nanoemulsões são uma fina dispersão de óleo em água e estabilizadas por surfactantes (BOUCHEMAL et al., 2004), de escala nanométrica com diâmetro até 500 nm e altamente estáveis (PORTO; ALMEIDA; VICENTINI, 2020; ANTON; 2008). Elas podem ser preparadas através de métodos de alta ou baixa energia (ANTON; VANDAMME, 2011).

Métodos de alta energia, utilizam equipamentos mecânicos que possibilitam o desenvolvimento de formulações com quantidade de energia, surfactante e natureza dos componentes de forma controlável. Métodos de baixa energia podem gerar gotas de emulsão pelo desvio das propriedades físico-químicas intrínsecas dos surfactantes, co-surfactantes e excipientes da formulação (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

O encapsulamento de compostos bioativos em sistemas de liberação nanométricos como as nanoemulsões, vem apresentando bom desempenho e boa ação antimicrobiana contra microrganismos correlacionados à mastite bovina (KHALAF et al., 2022; CECCHINI et al., 2021; KEYKHASALAR; TABRIZI; ARDALAN, 2020).

As nanoemulsão são considerados ótimos nanocarreadores, melhorando a estabilidade do extrato encapsulado, fornecendo proteção, com aumento da penetração, melhora da solubilidade, dissolução, absorção, permeação da biomembrana e biodisponibilidade dos compostos (HARWANSH et al., 2019).

Estas características podem diminuir alguns dos problemas relacionados às baixas taxas de cura bacteriológica da mastite bovina, em decorrência da baixa penetração e retenção intracelular dos antibióticos e pela não difusão de antibióticos ácidos através da membrana lisossômica em pH extracelular ou citoplasmático neutro (GRUET et al., 2001).

O desenvolvimento de produtos nanoestruturados aplicáveis ao tratamento de mastite bovina, se torna uma alternativa para controle e combate às infecções altamente impactantes, no cenário emergente de resistência antimicrobiana. Tais produtos podem representar uma

solução aos crescentes problemas de resíduos farmacológicos na produção animal e contaminação ambiental.

4 NANOEMULSÃO DE MACELA (NE-ML)

A nanoemulsão de macela (NE-ML) desenvolvida pelo grupo de pesquisa do LABINAT-UFSC (PINHEIRO MACHADO et al., 2020; PINHEIRO MACHADO, 2021) é caracterizada como um sistema de liberação sustentável de compostos bioativos com ação antimicrobiana. A partir de protocolos experimentais, foi possível preparar e caracterizar o extrato de macela e sua encapsulação. O tamanho médio das partículas da NE-ML foi em torno de 200 nm, com distribuição monodispersa (distribuição de tamanho estreita) ($PdI < 0,2$) e uma eficiência da encapsulação dos compostos do extrato nas nanopartículas superior a 94% (PINHEIRO MACHADO et al., 2020).

Os compostos químicos majoritários isolados das inflorescências de macela foram 3-O-metilquercetina ($187,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}^{-1}$), achyrobichalcona (ACB) ($155,4 \pm 11,6 \mu\text{g/mL}^{-1}$), quercetina ($76,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}^{-1}$) e luteolina ($30,4 \pm 0,0 \mu\text{g/mL}^{-1}$) (PINHEIRO MACHADO et al., 2020). A formulação mostrou estabilidade física ao longo de 160 dias, em temperatura ambiente.

A concentração inibitória mínima (CIM) da NE-ML frente a cepas e isolados de *S. aureus* foi $125 \mu\text{g/mL}$ de extrato bruto, o que correspondia a 5% da nanoemulsão (v/v). A formulação mostrou também capacidade de inibição da formação de biofilmes formados por bactérias planctônicas, com redução de massa superior a 64% (concentração inibitória mínima do biofilme de 25% v/v) e capacidade de erradicação de biofilme, com uma redução de massa superior a 73% (concentração mínima de erradicação do biofilme – MBEC, de 80% v/v). A formulação foi capaz de remover o biofilme previamente formado ao longo de 48h (PINHEIRO MACHADO et al., 2020).

A NE-ML foi incorporada em nanocompósitos a base de polímeros naturais (mucilagem de linhaça e k-carragenana), para o desenvolvimento de um hidrogel antimicrobiano, visando a terapêutica intramamária da mastite bovina. O produto foi otimizado quanto suas propriedades físico-químicas, onde a mucilagem de linhaça e k-carragenana aumentaram a viscosidade da formulação (com características termoreversíveis). O hidrogel também apresentou um perfil de liberação gradativo dos compostos fenólicos totais em 72 h e, além disso, foi constatado seu efeito bactericida, com inibição do crescimento de *S. aureus* (ATCC 33592) até 8 h de incubação (PINHEIRO MACHADO, 2021).

Tais resultados (PINHEIRO MACHADO et al., 2022; PINHEIRO MACHADO, 2021; PINHEIRO MACHADO et al., 2020) justificaram o pedido de registro da patente

depositada sob o número BR 10 2021 008630 0. Considerando o potencial de inovação dessa tecnologia e o impacto sobre um setor de grande relevância no contexto da pecuária brasileira, faz-se necessário estudos que permitam avançar no grau de maturidade tecnológica da mesma (TRL). Estudos como os propostos no presente trabalho de gerenciamento de incertezas, relacionadas a esta tecnologia, subsidiarão uma possível transferência tecnológica para a indústria nacional e, conseqüentemente, acrescentarão com estratégias aplicáveis no contexto da Saúde Única, que estimulam a produção animal em sistemas de criação orgânica ou agroecológica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CEPAS E ISOLADOS BACTERIANOS

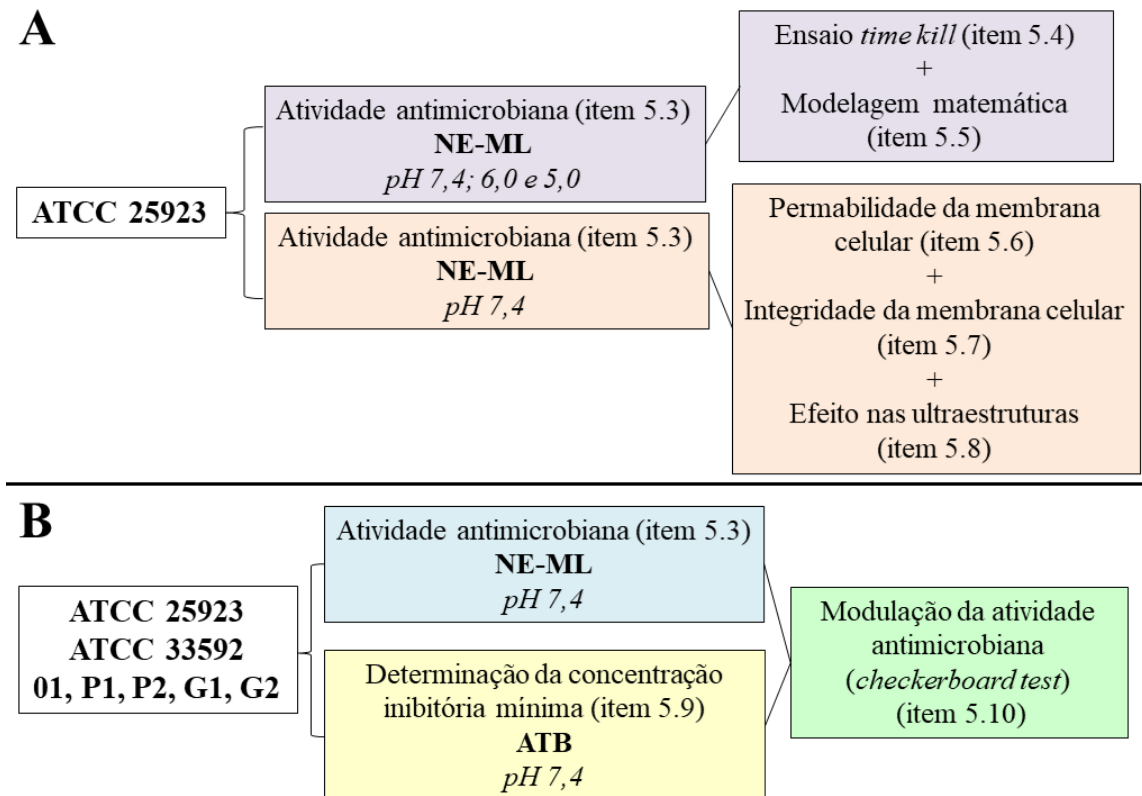
Foram utilizadas as cepas bacterianas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 33592 e isolados de leite de animais com mastite subclínica (n=5) (KUHNNEN et al., 2021). A identificação das cepas e isolados foi previamente confirmada a partir da técnica de coloração de gram positiva e, em seguida, a confirmação do gênero estafilococos ocorreu por ensaios bioquímicos positivos para os testes da catalase, coagulase, fermentação de carboidratos (manitol) e Voges Proskauer (VP) (QUINN et al., 1994).

A figura 3 mostra o fluxograma de trabalho com as cepa padrão e os isolados bacterianos de *S. aureus*. A atividade antimicrobiana da NE-ML contra a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 foi determinada nos pH 7,4; 6,0 e 5,0, para posterior realização do ensaio *time-kill* e aplicação de modelagem matemática. Através desses ensaios pretendeu-se avaliar a dinâmica populacional de crescimento e morte bacteriana em contato com a nanoformulação (figura 3 A).

Com a cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi também realizado os ensaios para verificar a ação da nanoformulação sobre a permeabilidade da membrana celular, integridade da membrana celular e seus efeitos nas ultraestruturas bacterianas (todos esses ensaios forma executados em pH 7,4) (figura 3 A).

Além disso, a atividade antimicrobiana da NE-ML e dos antimicrobianos comerciais penicilina, oxacilina e gentamicina foi avaliada em pH 7,4, contra as duas cepas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923 e 33592) e isolados bacterianos de leite mastítico (bacterioteca do LABINAT/CCA/UFSC - O1, P1, P2, G1 e G2). Estes ensaios foram realizados para avaliação da modulação da atividade antimicrobiana dos dois produtos, i.e., nanoformulação de macela e antimicrobiano comercial, quando em associação (*checkerboard test*) (figura 3B).

Figura 3 Fluxograma de trabalho do uso das cepas padrão e isolados de *S. aureus* para os diferentes ensaios realizados.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO E DA NANOEMULSÃO DE MACELA

O extrato de macela e a sua nanoencapsulação foram realizados a partir de protocolos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (PINHEIRO MACHADO et al., 2020). Brevemente, o extrato foi obtido a partir da maceração das inflorescências da macela em etanol 80% (1:60, m/v) por 10 minutos e filtrado a vácuo. A remoção do solvente foi realizada em evaporador rotativo à 60°C e 120 rpm. O rendimento da fase aquosa do extrato (± 20 mL) foi utilizado para a preparação de uma pré-emulsão com óleo de linhaça dourada e polissorbato 80 (Tween 80). Para a nanoemulsão se utilizou um homogeneizador de alta pressão (Homolab A10, Alitec, Brasil) (PINHEIRO MACHADO, 2021).

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA NE-ML

A avaliação da atividade antimicrobiana da NE-ML foi realizada através do método de microdiluição em caldo em microplaca de 96 poços (CLSI, 2006) com modificações. Através desta metodologia, se determinou a concentração inibitória mínima (CIM), que é definida como a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede completamente o crescimento visível do microrganismo em teste (KOWALSKA-KROCHMAL; DUDEK-WICHER, 2021).

Através dessa metodologia, oito diferentes concentrações da NE-ML foram testadas em pH 7,4; pH 6,0 e pH 5,0 contra a cepa padrão de *S. aureus* ATCC 25923 (figura 3). A acidificação dos meios foi realizada para simular condições extracelulares e intracelulares, como situações de internalização de *S. aureus* por fagolisossomos do hospedeiro (pH \leq 5) (WESTMAN; GRINSTEIN, 2020). A correção dos pH 6,0 e 5,0 ocorreu através da acidificação do caldo com ácido clorídrico (HCl 0,1M). A faixa de concentração da NE-ML testada para os três pH foi de 80% a 0,62% (v/v) que equivale a 1000 $\mu\text{g/mL}$ a 7,8 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de macela nanoencapsulado. A cepa padrão *S. aureus* ATCC 33592 e os isolados bacterianos (n=5) também foram testados contra a NE-ML em pH 7,4 (figura 3).

A densidade populacional inicial do inóculo bacteriano foi padronizada por meio do controle de turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^7$ a 10^8 UFC/ mL^{-1}), em espectrofotômetro UV-VIS (modelo Bel UV- M51), 623 nm. As diferentes concentrações da NE-ML foram obtidas por diluição seriada em 100 μL de caldo Mueller Hinton (MH), com 10 μL do inóculo bacteriano pipetados nos poços da microplaca, correspondendo a uma densidade bacteriana de 10^5 UFC/ mL^{-1} . Foi realizado o controle de crescimento bacteriano e o controle de esterilidade da NE-ML e do caldo. A microplaca foi incubada a $\pm 37^\circ\text{C}$ por 18 a 24 h em estufa bacteriológica. A CIM foi confirmada visualmente pela adição de 50 μL de resazurina ($100 \mu\text{g/mL}^{-1}$), uma vez que as células bacterianas metabolicamente ativas são capazes de reduzir a resazurina para resorufina. Desse modo, quando houve atividade bacteriana, os poços passaram da coloração azul para rosa, sendo possível determinar a CIM como a linha de poços azuis imediatamente acima da linha de poços rosas (SARKER et al., 2007). Os ensaios foram realizados em triplicata.

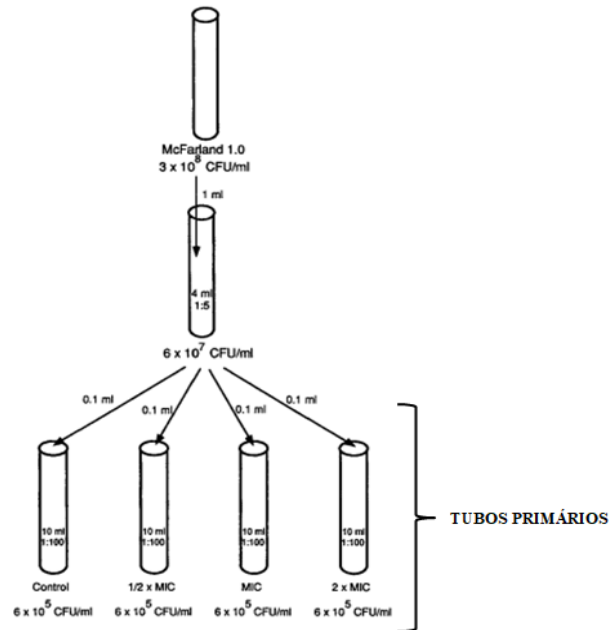
5.4 CURVAS DE CRESCIMENTO E MORTE BACTERIANA

O ensaio de curva de crescimento, também chamado de *time-kill* (LEBER, 2016), permitiu avaliar a dinâmica da densidade populacional bacteriana que está em contato com diferentes concentrações de um composto antimicrobiano, ao longo do tempo. O método se

baseou na adição de um inóculo padronizado a um meio líquido (caldo) contendo concentrações distintas de um antimicrobiano (nanoemulsão de macela) e, a partir de diluições seriadas, se determinou o número de unidades formadoras de colônias (UFC) viáveis. A cepa padrão utilizada neste ensaio foi a *S. aureus* ATCC 25923 (figura 3). A NE-ML foi avaliada nas concentrações de 0,5 CIM, 1 CIM e 2 CIM. No pH 7,4 e 6,0, estas CIM correspondiam a 2,5%, 5% e 10% da NE-ML (v/v) (equivalentes a 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, e 250 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado, respectivamente). Em pH 5,0, a 0,5 CIM, 1 CIM e 2 CIM correspondiam a 1,25%, 2,5% e 5% da NE-ML (v/v) (equivalentes a 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL e 125 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado, respectivamente). Também se avaliou um controle de crescimento bacteriano (C) sem adição da NE-ML. Os tempos de avaliação foram t=0, 1, 2, 4, 8 e 24 h.

O inóculo bacteriano, ajustado a partir de um crescimento *overnight*, para uma suspensão de 0,5 McFarland, foi transferido (0,1 mL) para 5 mL de caldo MH e incubado em banho com agitação a $\pm 36^{\circ}\text{C}$ até turvação visível do caldo, correspondendo a fase mid-log da bactéria. Após, a suspensão incubada foi ajustada com salina 0,9% para uma nova suspensão de 1,0 McFarland, correspondendo a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL (figura 4). Uma alíquota de 1 mL da suspensão 1,0 McFarland foi adicionada em 4 mL de caldo MH (1:5), correspondendo a uma suspensão bacteriana de $6,0 \times 10^7$ UFC/mL. Desta suspensão $6,0 \times 10^7$ UFC/mL, retirou-se 0,1 mL, o qual foi adicionado a tubos contendo 10 mL de caldo MH com as diferentes concentrações de NE-ML a serem testadas. Estes tubos foram considerados os tubos primários e identificados como 0,5 CIM, 1 CIM, 2 CIM e C, com uma densidade populacional aproximada de 6×10^5 UFC/mL.

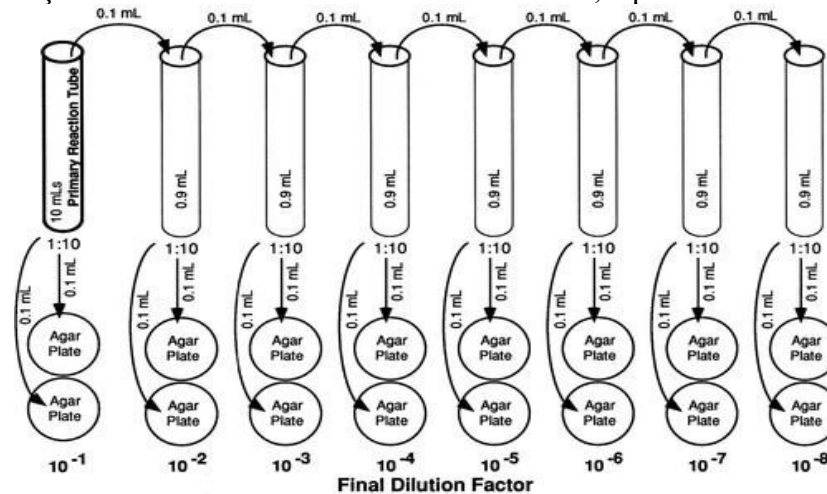
Figura 4 Preparação do inóculo bacteriano para a metodologia *time-kill*.



Fonte: Adaptado de Leber, 2016.

Os tubos primários (10^{-1}) foram incubados em banho com agitação e a cada horário estipulado para a avaliação ($t=0, 1, 2, 4, 8$ e 24 h) foram removidas alíquotas (0,1 mL) e diluídas serialmente com 0,9 mL de salina 0,9%, até atingir a diluição final de 10^{-8} (figura 5). Os tubos primários com as diferentes concentrações de NE-ML retornaram para a incubação até o próximo horário da avaliação, quando foram novamente retiradas alíquotas (0,1 mL) e realizadas novas diluições seriadas no novo horário. Para cada diluição seriada realizada (10^{-1} a 10^{-8}), de cada uma das concentrações testadas, foram removidas alíquotas (0,1 mL) e plaqueadas em ágar Mueller-Hinton em duplicata, incubadas em estufa a ± 35 °C por 24 h para posterior contagem de UFC.

Figura 5 Diluições seriadas realizadas no ensaio time-kill, a partir de cada tubo primário.



Fonte: Adaptado de Leber, 2016.

O controle de esterilidade foi realizado com um tubo contendo 10 mL de caldo sem inóculo e NE-ML e alíquotas (0,1 mL) de seu conteúdo foram plaqueadas em ágar Mueller-Hinton, nos t=0 h e t=24 h. Ao final do experimento, seu conteúdo apresentou uma característica límpida indicando a esterilidade do meio de crescimento. A contagem bacteriana foi realizada preferencialmente das placas contendo entre 30-300 de UFC, para cada concentração e horário. Os dados obtidos permitiram a criação de curvas de crescimento e morte bacteriana (Log_{10} UFC/mL) em relação ao tempo (h), exposta às concentrações da NE-ML. Os ensaios para cada pH foram realizados de forma independente.

5.5 MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS À DINÂMICA POPULACIONAL DE CRESCIMENTO E MORTE DE *S. AUREUS*

Aos dados de densidade populacional bacteriana (Log_{10} UFC/mL), ao longo do tempo (h), obtidos no ensaio *time-kill* com a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 em pH 7,4; 6,0 e 5,0 (figura 3), foram aplicados modelos matemáticos sigmoidais não lineares de Gompertz e Hill para explicar a dependência da evolução temporal das unidades formadoras de colônias, nos diferentes pH.

No modelo de Gompertz (equação 1), utilizado para as situações em que ocorreu crescimento populacional bacteriano, o logaritmo decimal das contagens bacterianas (Log_{10} UFC/mL) no tempo (h) foi expresso como:

$$\text{Log } N = a \exp[-\exp(-k(t-t_c))] \quad (1)$$

A densidade populacional máxima (MPD) é dada por $MPD = a$. A taxa de crescimento é obtida por $\mu = k\alpha / e$ (e é base do logaritmo natural, $e = 2.7182$). A duração da

fase de latência (LPD) ou duração do período de latência pode ser obtida como $LPD = \frac{1}{k} + t_c$ (dado em horas).

Os parâmetros a , k e t_c são ajustados e aplicados na equação (1), onde a fornece o valor de saturação da curva ($a = MPD$); k se refere à declividade da curva e define a taxa de crescimento populacional ($\mu = k\alpha / e$); t_c corresponde ao tempo em que a densidade populacional é apenas 36% do seu valor máximo ($MPD/e = 0.36 MPD$). Por sua vez, LPD corresponde ao tempo em que a densidade populacional é 69% do seu valor máximo ($MPD/e^{0.36} = 0.69MPD$).

A partir do Modelo de Gompertz obtivemos a determinação da densidade populacional máxima ($MPD = \text{Log}_{10} \text{ UFC/mL}$), da taxa de crescimento populacional ($\mu = \text{Log}_{10} \text{ UFC/mL/hour}$) e da duração da fase de latência ou período de latência ($LPD = h$).

O Modelo de Hill, aplicado nas curvas de decréscimo populacional está representado pela equação (2):

$$N = N_0 + \frac{(N_f - N_0)t^\gamma}{T_{150}^\gamma + t^\gamma} \quad (2)$$

Onde N_0 é a população inicial, N_f é a população final e a diferença $N_0 - N_f$ representa a queda máxima (N_{\max}) na contagem bacteriana. γ é o coeficiente sigmoideal, ou sigmoidealidade. T_{150} refere-se ao tempo necessário para se alcançar 50% da inibição máxima bacteriana, ou seja, o tempo que leva para a população cair pela metade.

Também é realizada uma estimativa da concentração que leva a redução de 50% (C_{50}) do índice de extinção bacteriano (atividade antimicrobiana), expressa como uma função sigmoide da concentração (em $\mu\text{g/mL}$) (equação 3):

$$IE = IE_0 - \frac{(IE_0 - IE_f)C^\gamma}{C_{50}^\gamma + C^\gamma} \quad (3)$$

Onde IE é o índice de extinção ou atividade antibacteriana:

$$IE = \Delta \text{LogCFU}_{F-I} / \text{mL} = \text{LogCFU}_F / \text{mL} - \text{LogCFU}_I / \text{mL} \quad (4)$$

que é a diferença entre a medida final e a inicial em cada concentração. Na equação 3, o IE_0 é o índice para concentração nula e a diferença $IE_0 - IE_f = IE_{\max}$, que é a máxima redução em IE . C_{50} é a concentração que leva a uma redução em IE , que é 50% de IE_{\max} , ou seja, em C_{50} temos $IE = IE_0 - IE_{\max}/2$. \mathcal{N} é o parâmetro sigmoide.

5.6 EFEITO DA NE-ML SOBRE A PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR BACTERIANA

A alteração da permeabilidade da membrana bacteriana, pela ação de antimicrobianos, pode ser expressa através da condutividade elétrica relativa da membrana (DIAO et al., 2014). Desse modo, após a incubação *overnight* de cepas padrão *S. aureus* ATCC 25923, em pH 7,4 (figura 3), se procedeu com a centrifugação de uma suspensão bacteriana de aproximadamente $1,8$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/ mL^{-1} , a 7830 *ref* por 20 minutos (Centrífuga eppendorf modelo 5430R). O pellet bacteriano obtido foi lavado com glicose 5%, até que sua condutividade elétrica se equiparasse a condutividade elétrica de uma solução da glicose 5% pura, tornando-se isotônica. As bactérias isotônicas foram expostas a NE-ML, atingindo as concentrações de 1 CIM e 2 CIM (5 e 10% v/v da NE-ML, equivalentes a 125 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato de macela nanoencapsulado), seguido de incubação total por 3 h e a condutividade elétrica determinada (L2). As bactérias isotônicas foram tratadas com água fervente por 5 min e marcadas como controle (L0). A NE-ML nas concentrações de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1 CIM) e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2 CIM) foram adicionadas à glicose 5% e as condutividades elétricas destas soluções foram medidas e marcadas como L1. As condutividades elétricas foram medidas a cada 30 minutos, ao longo de 3 h, com um condutivímetro Digital Microprocessado Gehaka modelo CG 1800. A permeabilidade da membrana bacteriana foi expressa como condutividade elétrica relativa (%) e calculada como $(\%) = 100 \times (L2 - L1) / L0$ (DIAO et al., 2014).

5.7 EFEITO DA NE-ML SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR BACTERIANA

Para avaliar a integridade da membrana celular bacteriana foi realizado um *screening* inicial para detecção de macromoléculas, como ácidos nucleicos e proteínas, liberadas pelas

suspensões da cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923, em pH 7,4 (figura 3), tratadas com 1 CIM e 2 CIM de NE-ML (respectivamente 5 e 10% v/v de NE-ML equivalente a 125 e 250 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado). A partir da constatação da presença de material absorvente em DO_{260nm} e DO_{280nm}, obtidos pelo método espectrofotométrico UV-VIS, se procedeu com a determinação da concentração de proteínas totais das soluções, modificado de Diao et al. (2014).

As suspensões bacterianas de aproximadamente $1,8$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL⁻¹ foram centrifugadas a 7197 rcf por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em tampão PBS 0,1 M, por três vezes. À suspensão bacteriana em PBS 0,1M foram adicionadas NE-ML nas concentrações 1 CIM e 2 CIM e incubadas a $\pm 37^\circ\text{C}$. Uma solução bacteriana em tampão PBS 0,1 M sem NE-ML foi marcada como controle (C). Após 2 e 4 h de incubação, alíquotas foram coletadas, centrifugadas e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro, no comprimento de onda DO_{260nm} e DO_{280nm}. Os testes foram realizados em triplicata.

Para a determinação da concentração de proteínas totais foi utilizado o ensaio Bradford (BRADFORD, 1976) em microplaca. Este ensaio é um método colorimétrico em que o corante Coomassie Brilliant Blue BG-250 interage com proteínas que possuem aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas de alto peso molecular, deslocando o equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve em 595 nm. O método foi realizado a partir da determinação de uma curva padrão de uma solução estoque de albumina sérica bovina (BSA) (1 mg/mL). A suspensão bacteriana passou pelo mesmo processo descrito anteriormente para a determinação de constituintes celulares na DO_{260/280nm}. As amostras 1 CIM, 2 CIM e C foram pipetadas em duplicata (10 µL), adicionados 200 µL da solução de Bradford 20% e, após 5 minutos, foram lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 595 nm.

5.8 EFEITO DA NE-ML NAS ULTRAESTRUTURAS DE *S. AUREUS*

As alterações nas ultraestruturas bacterianas da cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 (figura 3) foram observadas através de micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os tempos utilizados no ensaio (4 h) foram selecionados com base nos resultados obtidos no ensaio de condutividade elétrica.

As concentrações de 1 CIM e 2 CIM da NE-ML (respectivamente 5 e 10% v/v de NE-ML equivalente a 125 e 250 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado) foram

adicionadas a uma suspensão bacteriana, de aproximadamente $1,8$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/ mL⁻¹, em caldo Mueller-Hinton, pH 7,4 (adaptado de DIAO et al., 2014). Um controle sem NE-ML foi incluído no ensaio.

Os tratamentos (1 CIM, 2 CIM e C) foram incubados a $\pm 37^\circ\text{C}$ e alíquotas (2,5 mL) foram retiradas no tempo 4 h, sendo centrifugadas por 10 minutos a 24°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano ressuspensionado em solução tampão PBS 0,1M e centrifugado, repetido por 2 vezes.

Ao final das lavagens com PBS 0,1M, foram adicionados 150 uL de solução fixadora Karnovsky aos pellets. Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão Cacodilato de sódio 0,1 M, com incubação de 5 minutos por 3 vezes. Após, as células foram pós fixadas com uma solução composta por tetróxido de ósmio (1%), ferrocianeto de potássio (8%) e cloreto de cálcio (5 mM) em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 30 a 45 minutos. As amostras foram novamente lavadas com tampão Cacodilato de sódio 0,1 M (± 150 uL), com incubação de 5 minutos por 3 vezes.

As amostras foram desidratadas com soluções crescentes de acetona 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, com um tempo de incubação de 10 minutos em cada solução. A última desidratação, em acetona 100%, foi realizada 2 vezes. Em seguida, se iniciou o processo de infiltração em resina epóxi (Embed-812, Electron Microscopy Sciences) de forma lenta. Soluções de acetona 100% e resina foram trocadas a cada 8 a 12 h, nas proporções 2:1, 1:1, 1:2, até atingir resina pura (100%). A polimerização total das amostras emblocadas ocorreu em estufa, a 60°C por 48 a 72 h. As amostras foram cortadas em ultramicrótomo e contrastadas com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo, para posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão (TEM 100kV - JEM-1011) (PERGO; BRITTA; GALLETTI, 2018; DE SOUZA, 2011).

5.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS CONTRA ISOLADOS BACTERIANOS DE *S. AUREUS*

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos beta-lactâmicos (oxacilina e penicilina) e antimicrobiano aminoglicosídeo (gentamicina) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em microplaca de 96 poços (CLSI, 2006), em pH 7,4, contra as cepas padrão *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 33592, e os isolados de *S. aureus* O1, P1, P2, G1 e G2 (figura 3).

A oxacilina (OXA) foi o antimicrobiano de escolha para teste contra as cepas padrão *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 33592 e contra o isolado bacteriano O1. Enquanto a penicilina (PEN) foi testada contra os isolados bacterianos P1 e P2, a gentamicina (GEN) foi o antimicrobiano de escolha contra os isolados bacterianos G1 e G2. A faixa de concentração testada para OXA e PEN foi de 8 a 0,062 µg/mL, e para a GEN foi de 16 a 0,125 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.10 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS PELA INTERAÇÃO COM A NE-ML

Para avaliar a capacidade modulatória da atividade antimicrobiana da NE-ML em associação com antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos contra *S. aureus* foi utilizada a metodologia *checkerboard test* (tabuleiro de xadrez). Este é um método de microdiluição que permite avaliar as atividades de combinações de diferentes concentrações de dois antimicrobianos distintos em tempo fixo, incluindo preferencialmente combinações de antimicrobianos de diferentes classes (LEBER, 2016).

A metodologia utilizou a microplaca de 96 poços em uma configuração 8 x 8 (colunas x linhas) para testar diferentes diluições de dois produtos antimicrobianos (ORHAN et al., 2005; BONAPACE et al., 2002), com as maiores concentrações de cada produto posicionadas em cantos opostos.

Para o desenvolvimento desta metodologia foi necessária a determinação prévia da CIM da NE-ML em pH 7,4 (cf. seção 5, “material e métodos”, item 5.3) e dos antimicrobianos beta-lactâmicos (oxacilina e penicilina) e aminoglicosídeos (gentamicina) em pH 7,4 (cf. seção 5, “material e métodos”, item 5.9) (figura 3).

A NE-ML foi testada em associação com a oxacilina (OXA) contra as cepas padrão *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 33592 e o isolado bacteriano O1. A NE-ML foi testada em associação com a penicilina (PEN) contra os isolados bacterianos P1 e P2. E a NE-ML foi testada em associação com a gentamicina (GEN) contra os isolados G1 e G2. A faixa de concentração testada para a NE-ML foi de 750 a 7,8 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado (equivalentes a 30 a 0,62% da NE-ML v/v). A faixa de concentração para a OXA e PEN foi de 4 a 0,031 µg/mL, e para a GEN foi de 8 a 0,062 µg/mL e 4 a 0,031 µg/mL, conforme as especificidades de cada cepa padrão e isolado de *S. aureus* necessários para atingir diferentes faixas de concentração na avaliação.

A NE-ML foi diluída serialmente ao longo das linhas da microplaca identificadas de A a H, da maior concentração para a menor concentração. Os antimicrobianos comerciais tiveram cada concentração diluída separadamente em eppendorfs, e foram adicionados às suas colunas correspondentes identificadas de 1 a 8 (da menor concentração para a maior concentração) (figura 6). NE-ML e antimicrobianos comerciais foram diluídos em caldo MH a fim de atingirem as concentrações desejadas em um volume final de 100 μL /poço.

Figura 6 *Checkerboard test* em configuração 8 x 8 utilizando dois produtos antimicrobianos distintos.

		1	2	3	4	5	6	7	8
Nanoemulsão de macela ($\mu\text{g/mL}$)	A	750							
	B	500							
	C	250							
	D	125							
	E	62,5							
	F	32,2							
	G	15,6							
	H	7,8							
		0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
		Antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)							

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O inóculo bacteriano (cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923, ATCC 33592 e isolados O1, P1, P2, G1 e G2) foi padronizado a partir do controle da turbidez equivalente a uma solução padrão 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^7$ a 10^8 UFC/ mL^{-1}) e diluído para atingir a concentração de 10^5 UFC/ mL , ao ser adicionado (10 μL) em todos os poços. A microplaca foi incubada à ± 35 °C por 18 a 24 h (BONAPACE et al., 2002; ORHAN et al., 2005). A adição de 50 μL de resazurina ($100 \mu\text{g/mL}^{-1}$) possibilitou a confirmação visual do crescimento bacteriano, para a interpretação dos resultados pela interface crescimento/inibição. As células bacterianas metabolicamente ativas foram capazes de reduzir a resazurina para resorufina, onde poços rosas representaram crescimento bacteriano e poços azuis representaram inibição de crescimento (SARKER et al., 2007).

Os ensaios de titulação *checkerboard* resultaram em um índice da concentração inibitória fracionada (IFIC ou ΣFIC) (LEBER, 2016) por poço testado na microplaca, que é calculado comparando a CIM dos agentes utilizados na combinação, com a CIM desses agentes sozinhos (equação 5):

$$\Sigma FIC = FIC A + FIC B \quad (5)$$

onde,

$$FIC A = \frac{CIM \text{ do agente A em combinação}}{CIM \text{ do agente A sozinho}} \quad \text{e} \quad FIC B = \frac{CIM \text{ do agente B em combinação}}{CIM \text{ do agente B sozinho}} \quad (6)$$

Exemplo:

$$\Sigma FIC = FIC A + FIC B$$

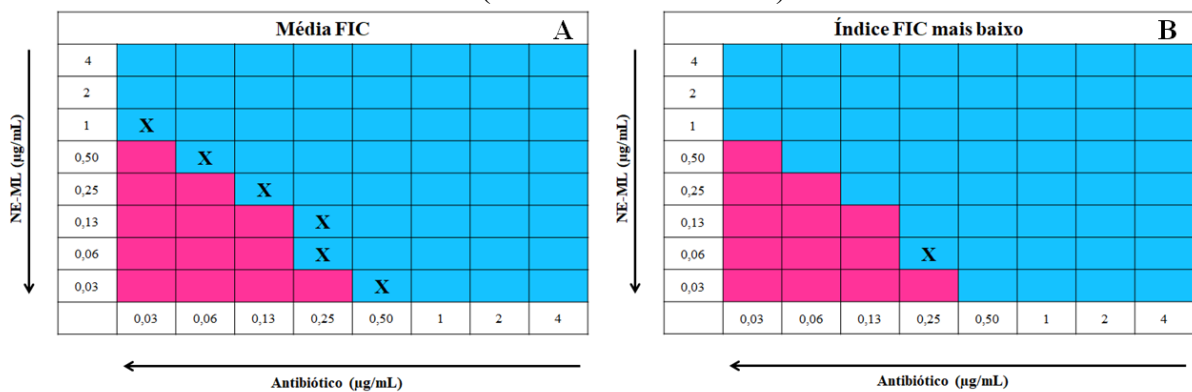
$$FIC A = \frac{1 \mu g/mL}{4 \mu g/mL} = 0,25 \quad FIC B = \frac{2 \mu g/mL}{8 \mu g/mL} = 0,25 \quad (7)$$

$$\Sigma FIC = 0,25 + 0,25$$

$$\Sigma FIC = 0,5$$

O resultado do índice da concentração inibitória fracionada (IFIC ou ΣFIC), pode ser interpretado como sinérgico, indiferente ou antagônico, a partir de duas metodologias distintas (figura 7).

Figura 7 Interpretação do índice FIC (IFIC ou ΣFIC) pelo método índice de concentração inibitória fracionada média (Média FIC) e índice de concentração inibitória fracionada mais baixo (Índice FIC mais baixo).



(A) Média FIC (EUCAST, 2000) e (B) Índice FIC mais baixo (LEBER, 2016). “X” representa o(s) valor(es) de FIC na interface de crescimento e inibição bacteriana que serão considerados para a determinação do Índice FIC. Rosa indica crescimento bacteriano e azul indica inibição de crescimento bacteriano.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

1) Média FIC (índice de concentração inibitória fracionada média): o índice FIC (IFIC ou ΣFIC) é calculado usando as concentrações dos poços azuis (não turvos) ao longo de cada linha e coluna da interface turbidez (poços corados em rosa) e

não turbidez (poços corados em azul). A soma dos vários índices FIC, dividida pelo número (quantidade) de FIC é designada como média FIC. Esta é interpretada como sinérgica ($\leq 0,5$), aditiva ($>0,5-1$), indiferente ($>1-2$) ou antagônica (≥ 2) (EUCAST, 2000).

2) Índice FIC mais baixo (índice de concentração inibitória fracionada mais baixo): é usado o índice FIC mais baixo de todos os poços não turvos (corados em azul) ao longo da interface turbidez (corados em rosa) e não turbidez (corados em azul). O resultado pode ser interpretado como sinérgico ($\leq 0,5$), indiferente ($>0,5 \leq 4$) ou antagônico (>4) (LEBER, 2016).

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

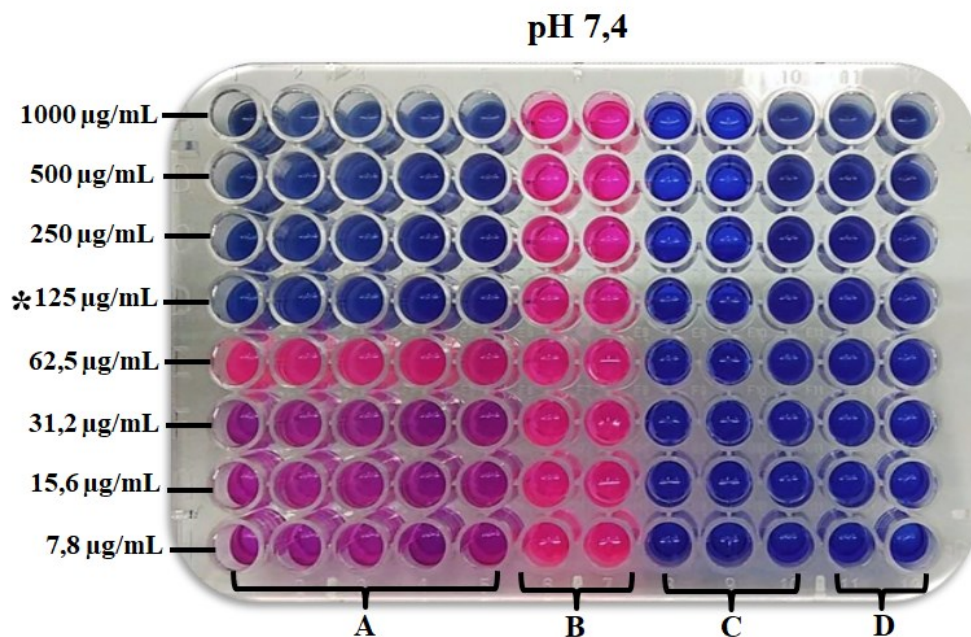
As análises estatísticas para a determinação de constituintes celulares e proteínas totais foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando o software Microsoft Excel. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados da modulação da NE-ML com antimicrobianos comerciais foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para os ensaios *time kill*, os dados sofreram transformação logarítmica e a modelagem matemática foi realizada com o software Orange 3.35.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA NE-ML EM MEIOS COM DIFERENTES PH

A concentração inibitória mínima (CIM) da NE-ML contra a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923, em pH 7,4 e 6,0 foi 5% (v/v), equivalente a 125 µg/mL de extrato de macela (figura 8), e em pH 5,0 foi 2,5% (v/v), equivalente a 62,5 µg/mL de extrato de macela. A CIM da cepa padrão *S. aureus* ATCC 33592 e dos isolados bacterianos O1, P1, P2, G1 e G2, crescidos em pH 7,4, também foi 5% de NE-ML (v/v), equivalente a 125 µg/mL de extrato de macela.

Figura 8 Teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da nanoemulsão de macela contra cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 em pH 7,4.



Determinação visual da CIM após a adição do corante resazurina em microplaca de 96 poços, em pH 7,4. (A) Caldo Mueller-Hinton, NE-ML e inóculo bacteriano; (B) controle de crescimento bacteriano; (C) controle de esterilidade do caldo Mueller-Hinton; (D) controle de esterilidade da NE-ML; (*) concentração inibitória mínima de 125µg/mL de extrato de macela encapsulado, equivalente a 5% de NE-ML (v/v).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os valores da CIM da NE-ML contra *S. aureus* ATCC 25923, em pH 7,4 estão em conformidade com os resultados obtidos durante o estudo de desenvolvimento da NE-ML realizado por PINHEIRO MACHADO et al. (2020). Por outro lado, em meio com pH 5,0, a CIM diminuiu duas vezes, passando para 2,5% (v/v), equivalente a 62,5 µg/mL de extrato de

macela nanoencapsulado. Resultados similares foram encontrados com o óleo essencial de *Melaleuca armillaris* (BULDAIN et al., 2021). Neste estudo, a CIM do óleo essencial de *M. armillaris*, em pH 7,4 e pH 6,5, foi 25µL/mL e diminuiu para 12,5 µL/mL em pH 5,0. Estas alterações podem ser explicadas pela influência da acidificação do meio no crescimento bacteriano ou pela alteração molecular dos produtos antimicrobianos em meio ácido.

É sabido que a alteração do pH pode afetar o desempenho de muitos antibióticos. Alguns antibióticos macrolídeos e aminoglicosídeos, em ambientes acidificados (pH 5,0) apresentam um aumento acentuado da CIM, de até 8 vezes, contra *S. aureus*. Em contraste, antibióticos beta-lactâmicos podem apresentar um aumento de desempenho em ambientes acidificados, levando a diminuição das suas concentrações inibitórias mínimas (BARCIA-MACAY et al., 2006).

Simular condições experimentais intracelulares e extracelulares é clinicamente interessante, pois *S. aureus* tem capacidade de crescimento em uma ampla faixa de concentração de pH, *i.e.*, de aproximadamente 4,0 a 9,8 (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Isso permite que as bactérias apresentem formas de infecção intracelular, sobrevivendo ao pH fagolisossomal, próximo ou inferior a 5,0, o que influencia na sua fuga do sistema imune e disseminação no hospedeiro (WESTMAN; GRINSTEIN, 2020). No entanto, os pH entre 6,0 e 7,0 são considerados ótimos para o crescimento de *S. aureus* (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005), devendo considerar a influência de outros fatores como temperatura (°C), atividade de água (*aw*) e presença de oxigênio. O leite também pode ser um fator que altera a atividade de compostos antimicrobianos utilizados para tratamento de mastite bovina. Extratos etanólicos de própolis apresentaram doses bactericidas 20 vezes maiores contra *S. aureus* cultivados em leite (SANTANA et al., 2012).

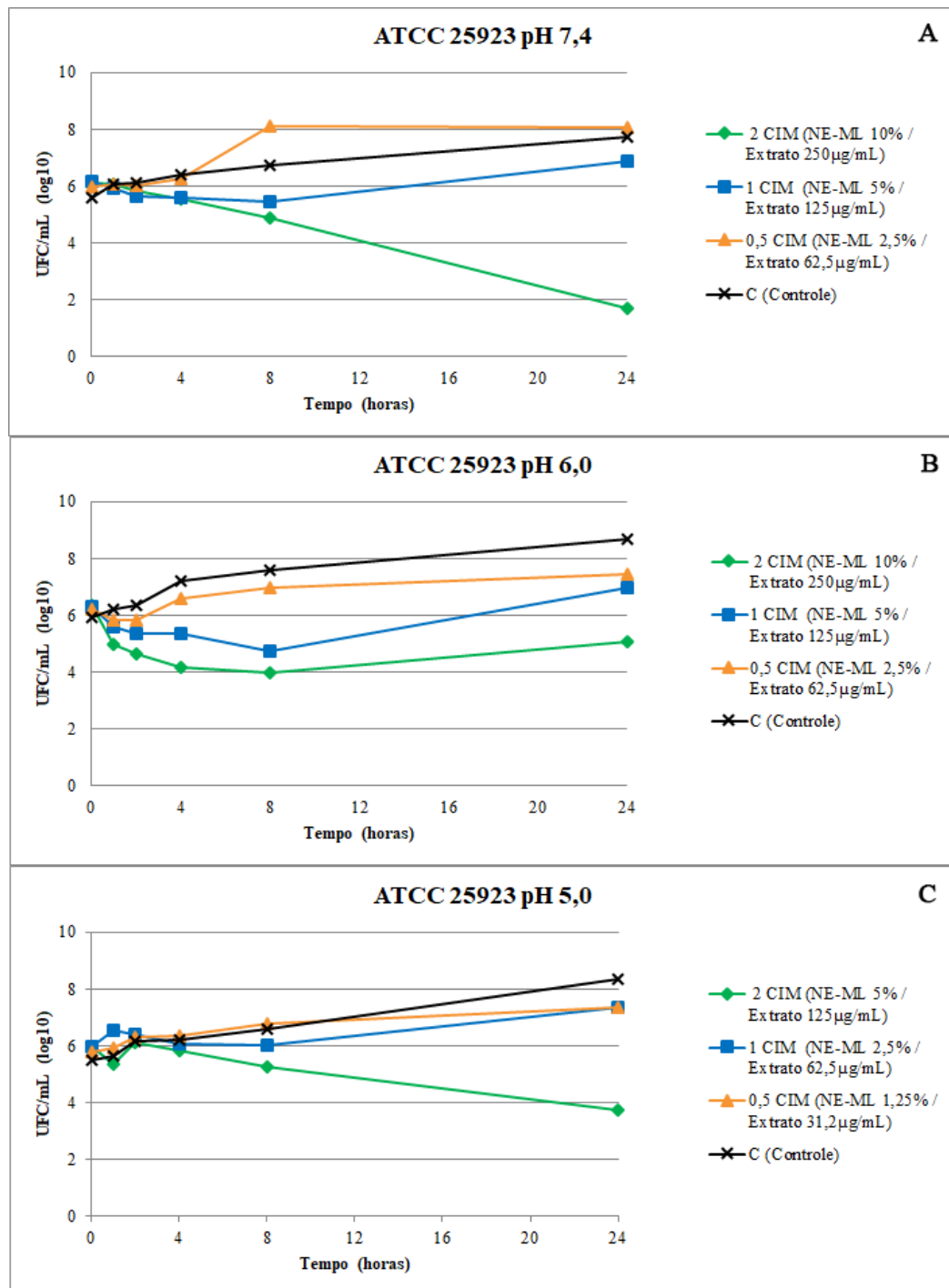
Estas informações nos levam a inferir que em pH 5,0 a atividade antimicrobiana da NE-ML aumenta (pela diminuição da sua CIM para 2,5% v/v, equivalente a 62,5 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado) porque o meio acidificado não apresenta condições ótimas para o crescimento bacteriano.

6.2 CURVAS DE CRESCIMENTO E MORTE BACTERIANA

As curvas de morte e crescimento bacteriano (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo ($t=0, 1, 2, 4, 8$ e 24 h) foram conduzidas em pH 7,4; 6,0 e 5,0. A cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 foi exposta às concentrações de 0,5 CIM, 1 CIM, 2 CIM da NE-ML. A CIM da NE-ML para pH 7,4; 6,0 e 5,0 foi apresentada na seção 6, “resultados e discussão”, item 6.1. A

figuras 9 (A, B e C) representa as curvas de crescimento de morte bacterianas obtidas neste ensaio.

Figura 9 Curvas de morte e crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 (log₁₀ UFC/mL) em função do tempo (h), em pH 7,4 (A); 6,0 (B) e 5,0 (C).



A CIM em pH 7,4 e 6,0 é 5% da NE-ML (v/v) que corresponde a 125 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado e em pH 5,0, a CIM é 2,5% da NE-ML (v/v) que corresponde a 62,5 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

De forma geral, os grupos controle, sem a presença da NE-ML, apresentaram crescimento constante da população bacteriana nos diferentes pH.

As bactérias expostas a 0,5 CIM em pH 6,0 (fig. 9 B) apresentaram diminuição da densidade populacional até 2 h. Após esse tempo, a NE-ML, na concentração testada, não foi capaz de afetar o crescimento bacteriano. Nos pH 7,4 (fig. 9 A) e pH 5,0 (fig. 9 C), a NE-ML, na concentração 0,5 CIM, não foi capaz de evitar o aumento da densidade populacional em nenhum dos tempos analisados. Isso nos indica que uma concentração subinibitória de NE-ML, em qualquer dos pH testados, não é capaz de afetar a dinâmica de crescimento populacional bacteriano.

A patogênese de infecções estafilocócicas pode ser influenciada pela administração de concentrações menores do que a concentração inibitória mínima de um antimicrobiano. Além disso, sabe-se que a presença de concentrações subinibitórias no meio ambiente podem levar a pressão de seleção bacteriana (CHOW; GHALY; GILLINGS, 2021) e ao aumento das taxas de mutação bacteriana, de forma a afetar diretamente a expressão de fatores de virulência, por meio de regulação negativa ou positiva (CHEN et al., 2021).

Já foi demonstrado que concentrações subinibitórias de oxacilina, moxifloxacina e linezolida levaram ao desenvolvimento de um fenótipo bacteriano hiperadesivo, com aumento da transcrição de *fnbA/B* que codifica as proteínas A e B de ligação à fibronectina, envolvidas no processo de adesão e invasão bacteriana (RASIGADE et al., 2011). Em contrapartida, concentrações subinibitórias de clindamicina suprimiram a expressão de mRNA responsáveis pela produção de toxinas de *S. aureus*, e.g., PVL, Hla e SpA (OTTO et al., 2013).

A NE-ML na concentração de 1 CIM, em pH 7,4 (fig. 9 A) e pH 6,0 (fig. 9 B) foi capaz de diminuir o crescimento bacteriano até 8 h de exposição, em 0,68 log₁₀ (UFC/mL) e 1,53 log₁₀ (UFC/mL), respectivamente. Após esse tempo (t= 8 h), a NE-ML não foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano, observando o crescimento das curvas nessa concentração (fig. 9 A e B). Nesta mesma concentração de 1 CIM no pH 5,0, houve crescimento até 2 h de exposição, com decréscimo na densidade populacional até 8 h. Após esse tempo, houve novo crescimento observado em 24 h (fig. 9 C).

Podemos inferir que a NE-ML em sua 1 CIM, independente do pH analisado, pode requerer uma frequência de administração com intervalo de aproximadamente 8 h. Mas, para afirmar isto, é necessário compreender se as flutuações na concentração da NE-ML, entre este intervalo de tempo (de 0 h até 8 h), são apropriados para a manutenção da terapia medicamentosa.

Sabe-se que as concentrações dos antibióticos diminuem ao longo do tempo após sua administração (CHEN et al., 2021) e através da determinação do índice terapêutico (ou janela terapêutica) pode se estabelecer o tempo em que a concentração do produto oferece o efeito

desejado, sem causar efeitos tóxicos quando em maiores concentrações ou que não apresente efeito em concentrações reduzidas (MULLER; MILTON, 2012).

Para entendermos a relação da concentração da NE-ML ao longo do tempo no organismo do hospedeiro, é necessário realizar estudos farmacocinéticos (FLORIO; DE SOUSA; GÓRNIK, 2017) que elucidem os processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção do fármaco no organismo animal, que influenciam na determinação da frequência de administração da NE-ML.

A NE-ML na concentração de 2 CIM, em pH 7,4, diminuiu a densidade populacional inicial de $6,10 \log_{10}$ (UFC/mL) para $1,7 \log_{10}$ (UFC/mL), em 24 h (fig. 9 A). Essa redução representa uma diminuição de $4,42 \log_{10}$ (UFC/mL) e foi a única concentração da NE-ML, nos diferentes pH testados, que apresentou atividade bactericida dependente do tempo.

Em pH 5,0 (fig. 9 C), a concentração de 2 CIM da NE-ML também apresentou diminuição do crescimento bacteriano. Em 24 h, atingiu $3,76 \log_{10}$ (UFC/mL), o que representa uma diminuição de $2,22 \log_{10}$ (UFC/mL) da densidade populacional inicial. Aqui temos um indicativo de que a ação da NE-ML em ambientes ácidos, como o interior fagolisossomal, é efetiva para a eliminação bacteriana, pois ela não permitiu o crescimento bacteriano com a administração de única dosagem, ao longo de 24 h.

A partir desta redução expressiva da população bacteriana na presença de 2 CIM da NE-ML, podemos observar que maiores concentrações da NE-ML desempenham uma melhor atividade sobre o crescimento bacteriano, com o decorrer do tempo.

Já em pH 6,0 (fig. 9 B), nesta concentração (2 CIM) houve diminuição de $2,36 \log_{10}$ (UFC/mL) entre os tempos $t=0$ e $t=8$. A partir de 8 h, a densidade populacional voltou a crescer e em 24 h apresentou uma densidade populacional de $5,07 \log_{10}$ (UFC/mL). O crescimento bacteriano observado na concentração 2 CIM de NE-ML, em 24 h, pode ser explicado pelo fato de que o crescimento ótimo de *S. aureus* é entre pH 6,0 e 7,0 (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Assim, uma população bacteriana suscetível à ação da NE-ML possivelmente foi exterminada até 8 h e após este período, as bactérias sobreviventes podem ter apresentado uma resistência natural (MANCUSO et al., 2021), *i.e.*, induzida pela ativação de genes resultantes da exposição à NE-ML. Assim, estas bactérias resistentes à NE-ML se proliferaram, o que resultou no aumento das unidades formadoras de colônia, na análise em 24 h.

De forma geral, a NE-ML apresenta estabilidade e ação antimicrobiana nos diferentes pH testados. Em doses subinibitórias (0,5 CIM) a NE-ML não apresenta atividade antimicrobiana satisfatória que justifique seu emprego clínico. Também se sugere que a

frequência de administração da NE-ML esteja próxima a um intervalo de tempo de 8 h, sendo necessária sua reaplicação/administração. O produto é capaz de evitar o crescimento bacteriano ao longo de 24 h, com o aumento da sua concentração para 2 CIM, indicando que a mesma é dependente de tempo. Também é possível inferir que a NE-ML, em sua concentração 2 CIM, seja capaz de apresentar boa atividade antimicrobiana em ambientes intracelulares.

6.3 MODELOS MATEMÁTICOS APLICADOS À DINÂMICA POPULACIONAL DE CRESCIMENTO E MORTE DE *S. AUREUS*

A modelagem matemática foi realizada a partir dos dados de Log_{10} UFC/mL encontrados no ensaio *time-kill*. Os dados foram ajustados para cada valor de pH, de acordo com a dinâmica de crescimento ou declínio da população bacteriana ao longo do tempo. Desta maneira, foram utilizados o Modelo de Gompertz para situações de crescimento e o Modelo de Hill para decréscimo populacional (cf. seção 5, “material e métodos”, item 5.5).

Inicialmente, será realizada a análise das curvas de crescimento e morte obtidas para cada pH, seguido da análise comparativa entre os mesmos.

6.3.1 pH 7,4

Os resultados da taxa de crescimento populacional ($\mu = \log_{10}$ UFC/mL/h), densidade populacional máxima (MPD= \log_{10} UFC/mL) e duração da fase de latência ou período de latência (LPD=h) para o grupo controle e 0,5 CIM estão mostrados na tabela 1. A duração da fase de latência (LPD) se refere ao tempo, em horas, para que a densidade populacional atinja 69% do valor da densidade populacional máxima (MPD). O Modelo de Gompertz foi aplicado neste caso porque houve crescimento populacional ao longo das 24 h do experimento, para o grupo controle e 0,5 CIM.

Tabela 1 Taxa de crescimento populacional (μ), densidade populacional máxima (MPD) e duração da fase de latência (LPD) e coeficiente de determinação (R^2), obtidos pela equação de Gompertz aplicados aos dados de crescimento bacteriano (UFC/mL) dos grupos Controle e 0,5 CIM da NE-ML, em pH 7,4, ao longo de 24 h.

Modelo de Gompertz				
pH 7,4	R^2	μ (Log₁₀UFC/mL/h)	MPD (Log₁₀ UFC/mL)	LPD (h)
Controle	0,963	0,256	8,05	0,989
0,5 CIM	0,724	0,488	8,30	0,213

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O valor do R^2 do grupo controle indica que houve pequena dispersão das medidas, comparado ao grupo 0,5 CIM. Neste caso, um desvio na medida em $t=8$ h, para 0,5 CIM, acarretou uma maior taxa de crescimento ($\mu=0,488$), uma vez que o valor da constante k da equação de Gompertz aumenta (k se refere à declividade da curva e define a taxa de crescimento), diminuindo o valor de duração da fase de latência (LPD=0,213). Isto quer dizer que quanto mais rápido acontece o crescimento bacteriano, mais rápido o grupo atingirá 69% da sua densidade populacional máxima (MPD).

Por outro lado, houve uma redução do crescimento bacteriano para os grupos tratados com NE-ML na concentração 1 CIM e 2 CIM. Enquanto o grupo exposto a 2 CIM apresentou diminuição populacional durante todo o período de avaliação ($t=24$ h), no grupo 1 CIM esta redução ocorreu até 8 h. Entre 8 e 24 h houve um crescimento populacional de 25 vezes para o grupo 1 CIM.

Comparativamente, nesse mesmo intervalo de tempo (8 e 24 h), os grupos controle e 0,5 CIM cresceram 10 e 9 vezes, respectivamente. Isso se deve ao fato de que o controle e 0,5 CIM já apresentavam crescimento contínuo desde o início do experimento e a exposição da NE-ML na concentração 1 CIM, foi capaz de impedir o crescimento apenas até 8 h. Esta exposição pode ter selecionado bactérias resistentes capazes de alta proliferação em um menor período.

A dinâmica de diminuição das UFC/mL ao longo do tempo foi analisada ajustando-se os dados na equação de Hill. Para o grupo 1 CIM, os dados foram ajustados para os tempos entre 0 e 8 h e para o grupo 2 CIM, o ajuste foi feito entre 0 e 8 h e entre 0 e 24 h (tabela 2). Através da aplicação desse modelo matemático foi possível calcular N_{max} , que representa a queda máxima na contagem bacteriana e T_{150} , que se refere ao tempo necessário para a população cair pela metade e alcançar 50% da inibição máxima bacteriana.

Tabela 2 Inibição máxima bacteriana (N_{max}), tempo para alcançar 50 % da inibição máxima bacteriana (T_{150}) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos a partir da aplicação da equação de Hill, aplicados aos dados de decréscimo de UFC/mL dos grupos expostos a 1 CIM e 2 CIM da NE-ML, em pH 7,4, ao longo de 8 e 24 h.

Modelo de Hill					
pH 7,4	Intervalo de tempo avaliado (h)	R^2	População inicial (UFC/mL)	N_{max} (UFC/mL)	T_{150} (h)
1 CIM	0 a 8	0,978	$1,40 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	0,96
2 CIM	0 a 8	0,992	$1,31 \times 10^6$	$1,28 \times 10^6$	2,28
2 CIM	0 a 24	0,994	$1,31 \times 10^6$	$1,31 \times 10^6$	2,33

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A concentração 1 CIM da NE-ML foi capaz de reduzir em torno de 78,6% da população inicial no período de 8 h, enquanto para o mesmo intervalo de tempo, a concentração de 2 CIM reduziu cerca de 97,7% da população inicial. Se o grupo 2 CIM da NE-ML for analisado incluindo todo o período do experimento (24 h), cerca de 100% das bactérias foram eliminadas. O tempo necessário para se alcançar 50% da inibição bacteriana máxima (N_{max}) é menor para a concentração 1 CIM, comparada com 2 CIM.

6.3.2 pH 6,0

Para o pH 6,0 os grupos bacterianos controle e tratados com 0,5 CIM da NE-ML também apresentaram crescimento das UFC/mL, possibilitando a aplicação do Modelo de Gompertz (tabela 3).

Tabela 3 Taxa de crescimento populacional (μ), densidade populacional máxima (MPD) e duração da fase de latência (LPD) e coeficiente de determinação (R^2), obtidos pela equação de Gompertz aplicados aos dados de crescimento bacteriano (UFC/mL) dos grupos Controle e 0,5 CIM da NE-ML, em pH 6,0, ao longo de 24 h.

Modelo de Gompertz					
pH 6,0	Intervalo de tempo avaliado (h)	R^2	μ (Log₁₀UFC/mL/hora)	MPD (Log₁₀ UFC/mL)	LPD (h)
Controle	0 a 24	0,972	0,438	8,79	0,578
0,5 CIM	0 a 24	0,748	0,312	7,64	-2,98
0,5 CIM	0 a 24 (excluiu-se tempo 1 e 2)	0,989	0,282	7,60	-5,79

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O grupo controle teve um ajuste satisfatório ao modelo (R^2), onde este grupo apresentou uma maior taxa de crescimento (μ), comparado ao grupo 0,5 CIM. Por outro lado, o grupo 0,5 CIM da NE-ML apresentou baixo valor de R^2 (0,748) em decorrência de um grande desvio nas medidas nos tempos de 1 e 2 h. O ajuste do modelo após a exclusão destas duas medidas resultou em uma melhora significativa do valor de R^2 , embora com pouca variação para a taxa de crescimento e densidade populacional máxima. Já o valor de LPD passou para - 5,79 horas, evidenciando o alto desvio para as medidas em 1 e 2 h. Estes valores negativos de LPD indicam que as densidades populacionais das colônias já são superiores a 69% da densidade populacional máxima desde o início.

Da mesma forma para o que foi observado no pH 7,4, houve diminuição no crescimento bacteriano até 8 h para os grupos 1 CIM e 2 CIM da NE-ML. No intervalo entre 8 e 24 h houve um aumento nas UFC em 164 vezes para o grupo 1 CIM e 12 vezes para o grupo 2 CIM. Comparativamente, o grupo controle apresentou um crescimento de 12 vezes e de 3 vezes para o grupo 0,5 CIM. Dessa forma, neste caso, os dados foram ajustados com a exclusão das medidas obtidas em 24 h para o grupo 1 CIM e 2 CIM para aplicação do Modelo de Hill (tabela 4).

Tabela 4 Inibição máxima bacteriana (N_{max}), tempo para alcançar 50 % da inibição máxima bacteriana (T_{150}) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos a partir da aplicação da equação de Hill, aplicados aos dados de decréscimo de UFC/mL dos grupos expostos a 1 CIM e 2 CIM da NE-ML, em pH 6,0, ao longo de 8 h.

Modelo de Hill					
pH 6,0	Intervalo de tempo avaliado (h)	R^2	População inicial (UFC/mL)	N_{max} (UFC/mL)	T_{150} (h)
1 CIM	0 a 8	0,930	$1,93 \times 10^6$	$1,80 \times 10^6$	0,58
2 CIM	0 a 8	0,882	$2,16 \times 10^6$	$1,99 \times 10^6$	0,49

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os grupos apresentaram um bom ajuste (R^2) ao modelo e o tempo que demorou para se alcançar 50% da inibição bacteriana máxima (N_{max}), nas concentrações 1 CIM e 2 CIM da NE-ML, foi muito similar. Através deste modelo, podemos mostrar que a concentração de 1 CIM da NE-ML foi capaz de eliminar em torno de 93,26% da população inicial no período de 8h, enquanto para o mesmo período, a concentração de 2 CIM eliminou cerca de 92,12% da população inicial bacteriana.

6.3.3 pH 5,0

Assim como nos outros dois pH avaliados, a análise da dinâmica populacional do grupo controle e 0,5 CIM da NE-ML, em pH 5,0, mostrou crescimento das UFC, possibilitando o uso do modelo de Gompertz (tabela 5).

Tabela 5 Taxa de crescimento populacional (μ), densidade populacional máxima (MPD) e duração da fase de latência (LPD) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos pela equação de Gompertz, aplicados aos dados de crescimento bacteriano (UFC/mL) dos grupos Controle e 0,5 CIM da NE-ML, em pH 5,0, ao longo de 24 h.

Modelo de Gompertz					
pH 5,0	Intervalo de tempo avaliado (h)	R^2	μ (Log₁₀UFC/mL/hora)	MPD (Log₁₀ UFC/mL)	LPD (h)
Controle	0 a 24	0,968	0,159	10,50	12,92
0,5 CIM	0 a 24	0,962	0,322	7,47	-3,33

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Neste caso, os grupos tiveram um ajuste satisfatório ao modelo empregado (R^2). No grupo 0,5 CIM da NE-ML, a taxa de crescimento foi maior, com menor MPD e período de latência negativo, indicando que as densidades populacionais das colônias já eram superiores a 69% da densidade populacional média desde o início do experimento.

Para o grupo bacteriano exposto a 1 CIM da NE-ML foi observado crescimento das UFC entre 8 e 24 h, permitindo a aplicação do Modelo de Hill (tabela 6), a partir do ajuste de dados com a exclusão da medida obtida em 8 h. Além disso, um grande desvio foi encontrado em $t=0$ h e por isso foi feito um ajuste para aplicação da equação aos dados obtidos entre 1 e 8 h. O grupo 2 CIM da NE-ML apresentou decréscimo populacional até 24 h, com grande desvio em 1 e 2 h, os quais foram considerados pontos fora da curva para permitir um melhor ajuste ao Modelo de Hill.

Tabela 6 Inibição máxima bacteriana (N_{max}), tempo para alcançar 50 % da inibição máxima bacteriana (T_{150}) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos a partir da aplicação da equação de Hill, aplicados aos dados de decréscimo de UFC/mL dos grupos expostos a 1 CIM e 2 CIM da NE-ML, em pH 5,0, ao longo de 8 e 24 h.

Modelo de Hill					
pH 5,0	Intervalo de tempo avaliado (h)	R^2	População inicial (UFC/mL)	N_{max} (UFC/mL)	T_{150} (h)
1 CIM	1 a 8	0,987	$3,29 \times 10^6$	$2,41 \times 10^6$	2,38
2 CIM	2 a 24 (excluiu-se tempo 0 e 1)	0,992	$1,34 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	4,00
2 CIM	0 a 24 (excluiu-se tempo 1 e 2)	0,981	$9,55 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$	5,64

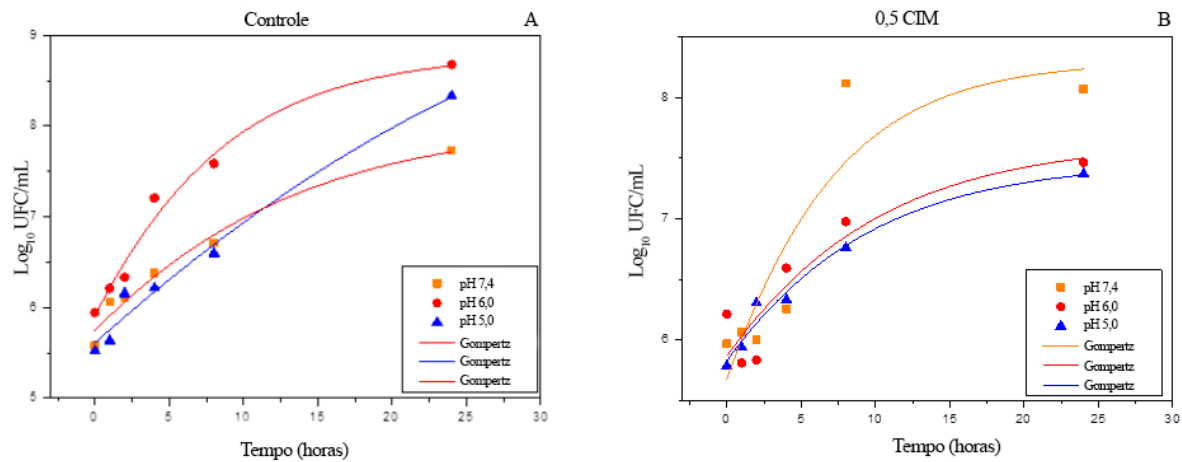
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Considerando os intervalos de tempos utilizados no Modelo de Hill, bons valores de R^2 foram alcançados para os 1 CIM e 2 CIM. Através do mesmo foi possível mostrar que 1 CIM foi capaz de eliminar aproximadamente 73% da população inicial até 8 h. Já a concentração de 2 CIM eliminou aproximadamente 100% da população inicial no período de 24 h. O tempo para atingir 50% da inibição bacteriana máxima (N_{max}) foi menor para 1 CIM.

6.3.4 Análise integrada da modelagem de Gompertz e Hill nos pH 7,4; 6,0 e 5,0

As curvas de crescimento populacional para o grupo controle e 0,5 CIM da NE-ML, nos três pH avaliados, a partir da aplicação da equação do Modelo de Gompertz estão mostradas na figura 10 A e B, respectivamente.

Figura 10 Curvas de crescimento bacteriano (Log₁₀ UFC/mL) ao longo de 24h, obtidos pela equação de Gompertz, para o grupo controle (A) e 0,5 CIM (B) da NE-ML, em pH 7,4, 6,0 e 5,0.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para os grupos controle (fig. 10 A) foi possível observar um crescimento maior e mais rápido para o pH 6,0, seguido do pH 5,0 e pH 7,4. O pH 5,0 tem um crescimento mais lento, porém ultrapassa a densidade populacional do pH 7,4 em 24 h. Na ausência da NE-ML, *S. aureus* tem melhores condições para crescimento e proliferação em meio com pH 6,0.

A análise das curvas de crescimento bacteriano expostas a 0,5 CIM da NE-ML (fig. 10 B) mostra que o pH 7,4 apresentou uma maior densidade populacional em 24 h, seguido do pH 6,0 e 5,0, os quais apresentaram densidades populacionais máximas muito próximas. Em pH 7,4 há uma grande discrepância na medida t=8 h, que influenciou na diminuição do coeficiente de determinação dado por R² (tabela 7).

Tabela 7 Taxa de crescimento populacional (μ), densidade populacional máxima (MPD), duração da fase de latência ou período de latência (LPD) e coeficiente de determinação (R^2), obtidos pela aplicação da equação de Gompertz nos dados de UFC/mL dos grupos controle e 0,5 CIM, em pH 7,4; 6,0 e 5,0.

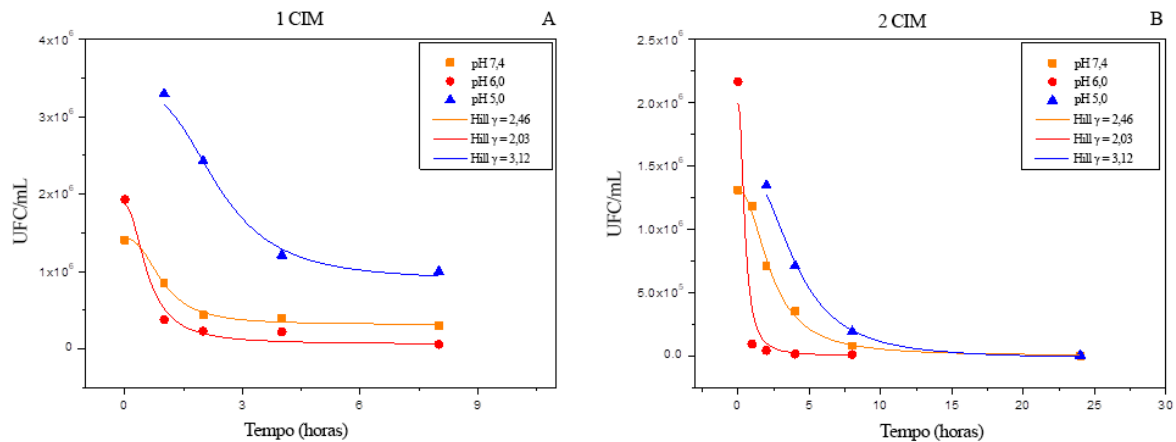
Parâmetro	pH 7,4		pH 6,0		pH 5,0	
	Controle	0,5CIM	Controle	0,5CIM	Controle	0,5CIM
μ (Log ₁₀ UFC/mL/hora)	0,256	0,488	0,438	0,312	0,159	0,322
MPD (Log ₁₀ UFC/mL)	8,05	8,30	8,79	7,64	10,5	7,47
LPD (h)	0,989	0,213	0,578	-2,98	12,92	-3,33
R^2	0,963	0,724	0,972	0,748	0,968	0,962

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

De forma geral, o modelo de Gompertz teve um bom ajuste aos dados (R^2) para os grupos controle e um menor para os grupos 0,5 CIM, nos diferentes pH testados. A maior taxa de crescimento populacional para o grupo controle foi observada no pH 6,0, assim como a maior densidade populacional máxima para o tempo 24 h, *i.e.*, que se refere ao crescimento da população até a sua saturação. A maior densidade populacional máxima do grupo controle em pH 5,0, (tabela 7), pode ser facilmente explicada pela visualização da sua curva de crescimento na figura 10 (A). A curva do grupo controle em pH 5,0 está longe da sua saturação, *i.e.*, a densidade populacional continuará aumentando, até 35 h, momento em que sua MPD atingirá 10,5 Log₁₀ UFC/mL.

As curvas de extinção bacteriana obtidas para os grupos 1 CIM e 2 CIM, nos diferentes pH, foram obtidas pela equação de Hill e serão analisadas a seguir (figura 11 A e B).

Figura 11 Curvas de morte bacteriana (UFC/mL), obtidas pela equação de Hill, em pH 7,4; 6,0 e 5,0, para a concentração 1 CIM da NE-ML ao longo de 8 h (A) e para a concentração 2 CIM da NE-ML, o pH 6,0 sofreu ajuste até 8 h e os pH 7,4 e 5,0 até 24 h (B).



(γ) coeficiente sigmoidal.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As medidas do grupo exposto a 1 CIM (fig. 11 A) ajustadas ao Modelo de Hill foram consideradas apenas até 8 h, em decorrência do crescimento bacteriano a partir desse tempo, levando a um melhor ajuste de dados nos diferentes pH, com bom coeficiente de determinação ($R^2 > 0.9$). O pH 6,0 apresentou uma densidade populacional mais elevada do que o pH 7,4, no tempo inicial (0 h). Para o pH 5,0 foi necessário um ajuste dos dados, possibilitando sua análise pelo Modelo de Hill, e o tempo inicial foi considerado em 1 h, com uma densidade populacional consideravelmente maior do que os outros do pH, no mesmo intervalo. As curvas dos pH 5,0 e 7,4 apresentaram maior suavidade de declínio, comparado ao pH 6,0, que possuiu um declínio abrupto entre os tempos 0 e 1 h, indicando um maior extermínio bacteriano inicial.

A figura 11 (B) mostra as curvas de extinção bacteriana obtidas para os grupos 2 CIM da NE-ML, nos pH 7,4; 6,0 e 5,0. Pode-se observar que em 2 CIM, também ocorreu um decaimento suave das curvas em pH 5,0 e 7,4, o que implicou em um maior tempo para se atingir 50% da inibição máxima bacteriana. No pH 6,0 se manteve a tendência da NE-ML na concentração 1 CIM (fig. 11 A), de declínio brusco no início do experimento. A concentração de 2 CIM apresentou uma excelente atividade antimicrobiana no tempo 24 h, em pH 7,4 e 5,0.

Diferentemente dos pH 7,4 e 5,0, o grupo 2 CIM em pH 6,0 (fig. 11 B) apresentou crescimento populacional em 24 h, sendo necessário a exclusão desta medida para melhor ajuste dos dados na equação de Hill.

A tabela 8 apresenta os parâmetros da queda máxima na contagem bacteriana (N_{max}), o tempo necessário para alcançar 50% da inibição máxima bacteriana (T_{150}), coeficiente

sigmoidal (γ) e coeficiente de determinação (R^2) obtidos com a aplicação da equação de Hill para os grupos 1 CIM e 2 CIM da NE-ML.

Tabela 8 Dados sobre a queda máxima na contagem bacteriana (N_{max}), o tempo necessário para alcançar 50% da inibição máxima bacteriana (T_{150}), coeficiente sigmoidal (γ) e coeficiente de determinação (R^2), obtidos pela aplicação do modelo de Hill nos dados dos grupos 1 CIM e 2 CIM da NE-ML, em três diferentes pH 7,4; 6,0 e 5,0.

Parâmetro	pH 7,4		pH 6,0		pH 5,0	
	1 CIM	2 CIM	1 CIM	2 CIM	1 CIM	2 CIM
População inicial (x 10 ⁶ UFC/mL)	1,40	1,31	1,93	2,16	3,29	1,34
N_{max} (x 10 ⁶ UFC/mL)	1,19	1,31	1,80	1,99	2,41	1,52
Redução bacteriana (%)	78,6	100	93,6	92,12	73	100
T_{150} (h)	0,965	2,33	0,589	0,495	2,38	4,00
Γ	2,46	2,15	2,03	2,11	3,12	2,47
R^2	0,978	0,994	0,930	0,882	0,987	0,992

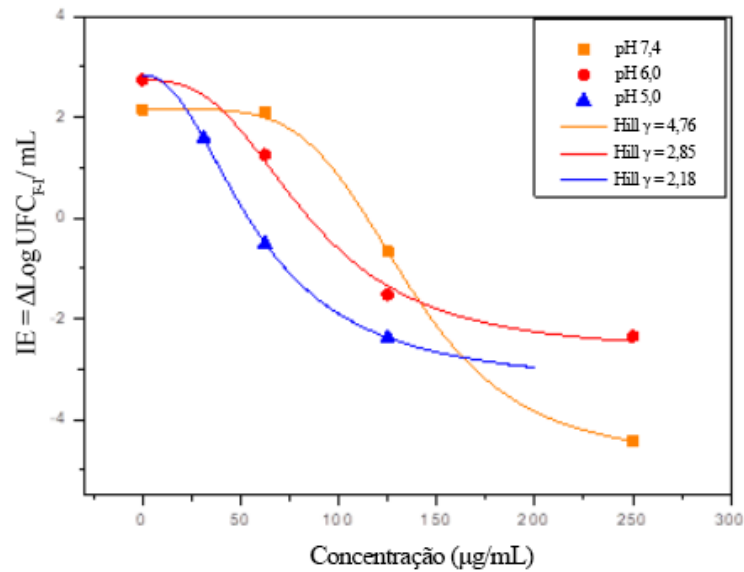
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As concentrações 1 CIM e 2 CIM da NE-ML em pH 6,0 apresentaram capacidade em inibir 50% da densidade populacional máxima em um menor tempo (T_{150}), comparada com as mesmas concentrações no pH 7,4 e 5,0. Tal fato pode ser verificado na figura 11 (A e B), em que as curvas de extinção são acentuadas nas primeiras horas em pH 6,0. Porém, a concentração 2 CIM da NE-ML nos pH 7,4 e 5,0 apresentaram uma melhor redução bacteriana, de aproximadamente 100%.

6.4 ÍNDICE DE EXTINÇÃO OU DE EFEITO ANTIMICROBIANO

A partir das concentrações utilizadas (0,5 CIM, 1 CIM, 2 CIM e controle) foi realizada uma estimativa da concentração que leva a redução de 50% (C_{50}) do índice de extinção bacteriano (atividade antimicrobiana), expressa como uma função sigmoide da concentração (em $\mu\text{g/mL}$) (figura 12).

Figura 12 Curva do efeito antimicrobiano (índice de extinção) modelados pela equação de Hill a partir das concentrações de 0,5 CIM, 1 CIM, 2 CIM de NE-ML e controle, nos pH 7,4; 6,0 e 5,0.



(γ) coeficiente sigmoidal.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Nas curvas do índice de extinção ou de efeito antimicrobiano (figura 12), podemos observar que uma curva suave como a de pH 7,4 reflete em altos valores do coeficiente sigmoidal ($\gamma = 4,76$) e C_{50} ($=134,9$). Curvas com declive mais acentuado como em pH 5,0 reflete em valores menores para γ e C_{50} (tabela 9).

Tabela 9 Índice de extinção máxima (IE_{max}); índice de concentração nula (IE_0); concentração que leva a redução de 50% do índice de extinção bacteriano (C_{50}), coeficiente sigmoidal (γ) e coeficiente de determinação (R^2), obtidos pela equação de Hill a partir das concentrações de 0,5 CIM, 1 CIM, 2 CIM de NE-ML e controle, para os pH 7,4; 6,0 e 5,0.

Índice de extinção (efeito antimicrobiano)

Parâmetro	pH 7.4	pH 6.0	pH 5.0
IE_0 (\log_{10} UFC/mL)	2,15	2,73	2,83
IE_{max} (\log_{10} UFC/mL)	6,93	5,41	6,18
C_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	134,9	84,3	58,2
Γ	4,76	2,85	2,18
R^2	0,999	0,995	0,999

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O índice de concentração nula (IE_0) se refere à mortandade natural da população bacteriana, que não está relacionada ao uso da NE-ML. Podemos observar que a medida em

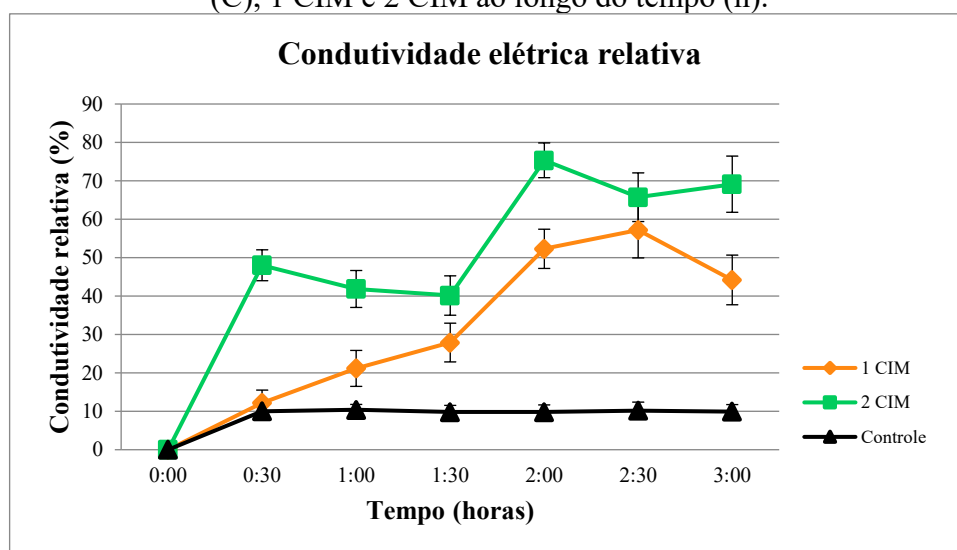
que o pH se torna mais ácido, há uma tendência de aumento da mortalidade natural bacteriana.

A mortalidade da população bacteriana que está relacionada à NE-ML é expressa pelo Índice de extinção máxima (IE_{max}), ou seja, é a máxima redução/mortalidade populacional devido a atividade antimicrobiana pela NE-ML. Ao utilizar a NE-ML, há maior mortalidade bacteriana (IE_{max}) em pH 7,4, seguido dos pH 5,0 e 6,0. Porém, devemos levar em consideração que uma menor concentração de NE-ML ($\mu\text{g/mL}$) em meio ácido, como o pH 5,0, é capaz de levar a uma diminuição de 50% da IE_{max} (C_{50}). Isso significa que a NE-ML tem uma melhor eficácia em meio ácido. Enquanto para atingir esse mesmo efeito de extermínio de 50%, em pH 7,4 essa concentração é superior, equivalendo a 134,9 $\mu\text{g/mL}$.

6.5 EFEITO DA NE-ML NA PERMEABILIDADE DA MEMBRANA CELULAR

O efeito da NE-ML na permeabilidade da membrana da cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923, em pH 7,4, foi determinado através da avaliação da condutividade elétrica da solução bacteriana. A figura 13 apresenta os valores do grupo controle e dos grupos 1 CIM (125 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de macela nanoencapsulado, equivalente a 5% da NE-ML v/v) e 2 CIM (250 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de macela encapsulado, equivalente a 10% da NE-ML v/v), com medições no intervalo de 30 minutos.

Figura 13 Condutividade elétrica relativa (%) de *S. aureus* ATCC 25923 dos grupos Controle (C), 1 CIM e 2 CIM ao longo do tempo (h).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No ensaio, foi detectada uma mudança na condutividade elétrica relativa da solução bacteriana após a exposição às diferentes concentrações da NE-ML (1 CIM e 2 CIM). Enquanto o grupo controle manteve a condutividade relativa estável (entre 9,8 a 10,4%), ao longo da avaliação, os grupos expostos à NE-ML apresentaram condutividade relativa consideravelmente maior nos 30 min iniciais de avaliação. O grupo 1 CIM apresentou um crescimento gradual da condutividade elétrica relativa, com um pico em 2,5 h de avaliação (57,19%). O grupo 2 CIM apresentou um aumento inicial acentuado em 30 min (48,02%) e uma condutividade relativa consideravelmente maior em 2 h (75,34%). Tais resultados sugerem que a membrana celular de *S. aureus* foi alterada após o tratamento com a NE-ML, possivelmente causando o vazamento de eletrólitos intracelulares para o meio de cultivo.

Podemos ainda observar que a alteração da permeabilidade da membrana é dependente da concentração do produto. Neste caso, o aumento na concentração da NE-ML, resultou também em um aumento da condutividade elétrica relativa. Resultados similares foram encontrados por Wei; Cui; Liu (2023) ao avaliarem a atividade do ácido madecássio, isolado de *Centella asiática*, na permeabilidade da membrana celular de *S. aureus*. O aumento da concentração do produto levou ao aumento da condutividade elétrica relativa ao longo do tempo, considerado um indicador da alteração da permeabilidade da membrana plasmática.

Mudanças relativamente pequenas na estrutura da membrana plasmática podem afetar negativamente o metabolismo e levar à morte celular. Se a permeabilidade da membrana plasmática for afetada, os eletrólitos intracelulares vazarão para o meio de cultura e a condutividade do sobrenadante irá refletir a permeabilidade da membrana plasmática (WEI; CUI; LIU, 2023).

A viscosidade da membrana plasmática influencia diretamente nas funções associadas a ela, como permeabilidade passiva de moléculas hidrofóbicas, transporte ativo de soluto e interações proteínas-proteínas (ZHANG; ROCK, 2008). Desse modo, é imprescindível que a membrana esteja íntegra para o desempenho de tais funções sem causar disfunções metabólicas (HARTMANN, et al., 2010) e consequente perda da funcionalidade celular (PÉREZ-PEINADO et al., 2018).

A membrana plasmática delimita o citoplasma e controla a difusão de pequenas moléculas e proteínas secretadas entre o espaço intracelular e extracelular (STRAHL; ERRINGTON, 2017), atuando como uma barreira reguladora à passagem de pequenos íons intracelulares que influenciam o potencial da membrana bacteriana. O potássio intracelular contribui para a manutenção do turgor da célula, da homeostase do pH e influencia na

atividade enzimática como os ribossomos (STAUZ et al., 2021). O aumento da condutividade significa que houve aumento da permeabilidade da membrana bacteriana, causando o vazamento do ingrediente intracelular como eletrólitos K^+ , Ca^{2+} e Na^+ (LI; YU, 2014).

6.6 EFEITO DA NE-ML NA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR

As suspensões de *S. aureus* ATCC 25923 tratadas com NE-ML nas concentrações de 1 CIM (125 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de macela nanoencapsulado, equivalente a 5% da NE-ML v/v) e 2 CIM (250 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de macela nanoencapsulado, equivalente a 10% da NE-ML v/v), passaram por um *screening* para detecção de material absorvente à 260 e 280 nm, o qual pode indicar a perda de macromoléculas como ácidos nucléicos (LUCENA-AGUILAR et al., 2016) e proteínas (STOSCHECK, 1990), por alteração da integridade da membrana plasmática. Os tempos utilizados no ensaio, 2 e 4 h, foram selecionados com base nos resultados obtidos no ensaio de condutividade elétrica.

Os valores médios das densidades ópticas a 260 e 280 nm das amostras, após 2 e 4 h de incubação, com a NE-ML nas concentrações 1 CIM, 2 CIM bem como do grupo controle estão descritos na tabela 10.

Tabela 10 Valores de densidade óptica a 260 e 280 nm das suspensões bacterianas expostas às concentrações de 1 CIM e 2 CIM de NE-ML, por 2 e 4 h.

	Liberação de constituintes celulares			
	A260nm		A280nm	
	2 h	4 h	2 h	4 h
Controle	0,039 c	0,037 c	0,024 c	0,022 c
1 CIM	0,238 b	0,247 b	0,240 b	0,244 b
2 CIM	0,477 a	0,540 a	0,498 a	0,552 a

Letras diferentes dentro de uma mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No grupo controle, pode ser observado valores baixos de densidade óptica obtidas em 260 nm e 280 nm, sugerindo que a célula bacteriana estava íntegra nas condições de cultivo. Nos grupos tratados com as concentrações de 1 CIM e 2 CIM da NE-ML, houve um aumento da densidade óptica da solução bacteriana em 260 nm e 280 nm. A densidade óptica aumentou com a concentração de 1 CIM da NE-ML em 2 h, comparada com o controle em 260 nm e 280 nm, sugerindo a liberação de constituintes celulares na solução. Após 4 h, a

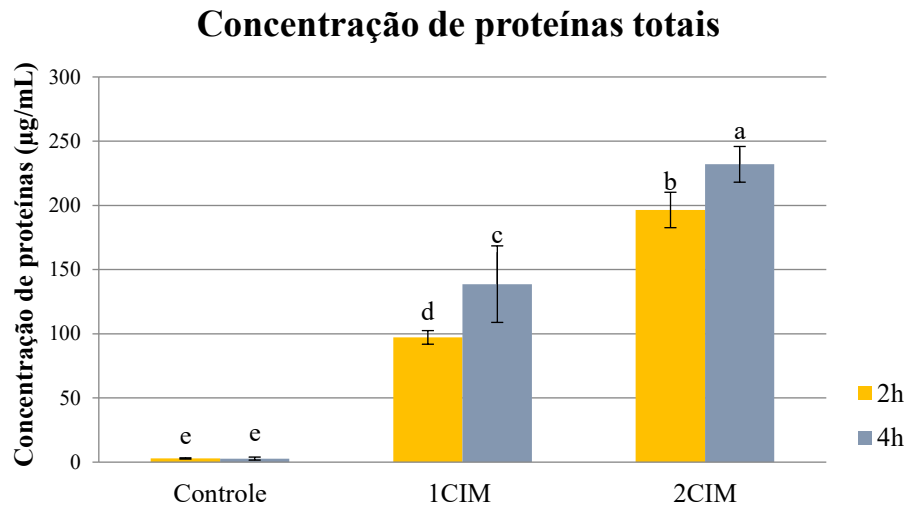
densidade óptica de 1 CIM em 260 nm e 280 nm não sofreu alteração significativa em relação, comparada com a 1 CIM em 2 h ($p>0,05$). O mesmo ocorreu no grupo tratado com 2 CIM, *i.e.*, houve um aumento dos valores de densidade óptica, em 260 nm e 280 nm, porém sem diferença significativa entre os tempos avaliados (2 e 4 h) ($p>0,05$).

A partir da constatação da liberação de material absorvente nos grupos tratados com NE-ML no comprimento de onda de 260 nm, procedeu-se com a quantificação de proteínas totais na suspensão bacteriana.

6.6.1 Quantificação de proteínas totais nas suspensões bacterianas expostas à NE-ML

O conteúdo de proteínas totais no meio de cultura dos grupos controle e dos expostos a 1 CIM e 2 CIM da NE-ML, por 2 e 4 h, é apresentado na figura 14.

Figura 14 Conteúdo de proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$) determinado na suspensão bacteriana após exposição a 1 CIM e 2 CIM da NE-ML e no grupo controle (C), por 2 e 4 h.



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre as médias ($p<0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O conteúdo de proteínas totais no meio de cultivo foi similar no grupo controle nos dois tempos avaliados, *i.e.*, 2 e 4 h ($p>0,05$). Diferentemente, a exposição a 1 CIM e 2 CIM da NE-ML resultou no aumento significativo no conteúdo de proteínas totais ($p<0,05$), considerando 2 e 4 h de exposição. Ao comparar os grupos controle e expostos à NE-ML (1 CIM e 2 CIM), em cada um dos tempos avaliados (2 e 4 h), verificou-se o aumento significativo da concentração de proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$) ($p<0,05$). Tais resultados indicam

danos à integridade da membrana plasmática de *S. aureus*, os quais são proporcionais a concentração da NE-ML no meio.

Estudos similares que avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de canela contra *S. aureus*, constataram a liberação de proteínas pela ação do óleo essencial. Os autores observaram que a concentração de proteínas aumentou com o tempo e em resposta ao aumento da concentração do óleo essencial de canela. A presença desses constituintes celulares no meio de cultivo indica, possivelmente, a ocorrência de dano e alteração na integridade da membrana plasmática (ZHANG et al., 2016).

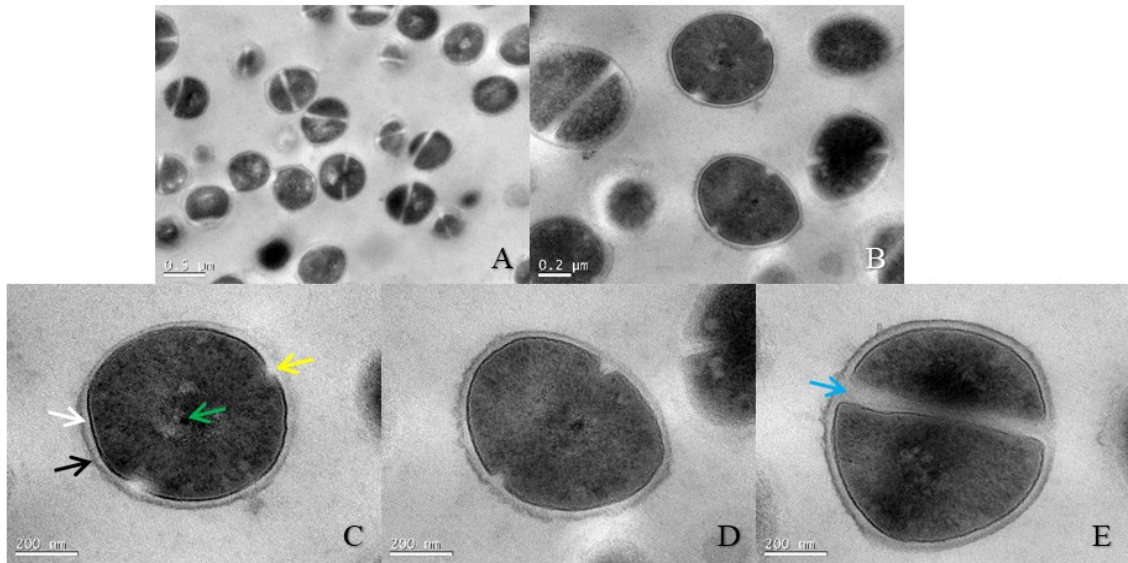
Alguns dos compostos bioativos que compõem o extrato de macela da nanoemulsão em estudo, *e.g.* quercetina e a luteolina, já foram associados à danos estruturais responsáveis por perda de função da membrana bacteriana. Os flavonoides epicatequina, quercetina e seus glicosídeos extraídos de folhas da goiaba branca apresentaram atividade bacteriostática contra *S. aureus*, através dos mecanismos de ruptura da estrutura e função da membrana celular bacteriana (ZHANG et al., 2020).

6.7 ANÁLISE DAS ULTRAESTRUTURAS DE *S. AUREUS*

As micrografias obtidas a partir da microscopia eletrônica de transmissão mostraram as alterações nas ultraestruturas de *S. aureus* ATCC 25923 pela ação da nanoemulsão de macela. As figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20 se referem às bactérias expostas nas concentrações 1 CIM e 2 CIM (125 e 250 µg/mL de extrato de macela nanoencapsulado, equivalentes a 5 e 10% da NE-ML v/v, respectivamente), por 4 h em tampão PBS 0,1M à 37°C.

As células bacterianas do grupo controle, *i.e.*, não expostas a NE-ML (figura 15), apresentaram características uniformes, com parede celular e membrana plasmática intactas e bem definidas. O relevo da parede celular apresentou característica rugosa a lisa. A membrana plasmática é visível como uma camada eletrodensa, logo abaixo da parede celular. Também é possível observar o citosol contendo o material genético bacteriano de forma aglomerada na região central das células, com pontos eletrodensos e eletrotransparentes. As células em divisão apresentaram características padrão de septação em diferentes fases, com presença de septos iniciais até a formação da parede transversal completa. Estas ultraestruturas também foram observadas em outras investigações com *S. aureus* controle/sem tratamento (GRIGOR'EVA et al., 2020; RAJ; HING, 2007).

Figura 15 Seção ultrafina de *S. aureus* ATCC 25923. Células controle, *i.e.*, não expostas à NE-ML, incubadas por 4 h em tampão PBS 0,1M a 37°C.

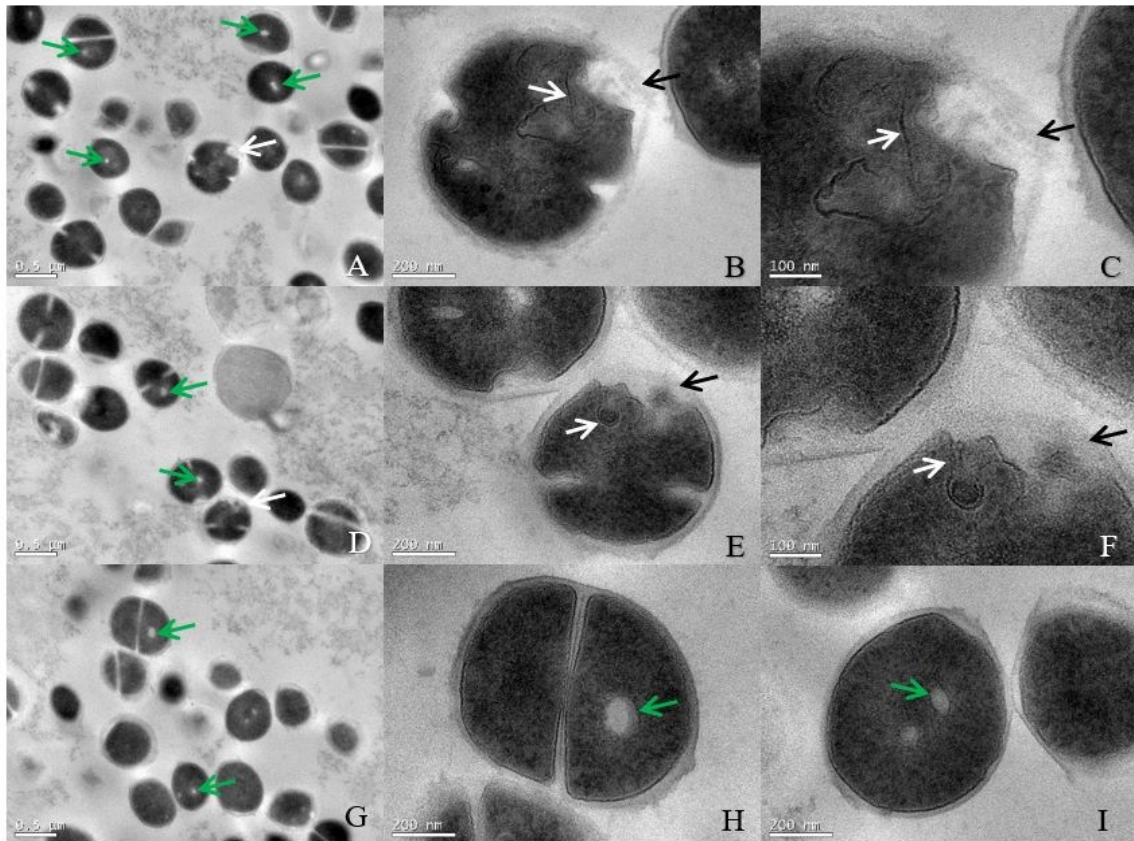


Seta preta indica a parede celular; seta branca indica a membrana plasmática; seta verde indica a região nuclear; seta amarela indica o início da formação do septo de divisão celular; seta azul indica a formação da parede transversal na célula em divisão.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Nas células tratadas com 1 CIM da NE-ML (fig. 16 A-F) foram encontradas invaginações da membrana plasmática e algumas áreas da parede celular perdem sua estrutura e definição (fig. 16 C e F). As células passaram a apresentar uma área eletrotransparente bastante pronunciada na região central do citosol (figura 16 G-I), denominada aqui como vacúolo eletrotransparente.

Figura 16 Seções ultrafinas de *S. aureus* ATCC 25923 expostas a 1 CIM da NE-ML por 4 h.



Setas verdes indicam a região nuclear com região eletrotransparente pronunciada; setas pretas indicam parede celular; setas brancas indicam áreas com invaginação da membrana plasmática.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O aumento da concentração da NE-ML para 2 CIM (Figuras 17, 18, 19 e 20) levou ao aumento da densidade das células, com escurecimento da região do citosol. As células continuaram apresentando invaginações da membrana celular (Figura 17, A-C). As células passaram a apresentar danos e desorganização na região do citoplasma, com vários aglomerados amorfos e eletrodensos dentro de toda a estrutura intracelular (Figura 18, A-F).

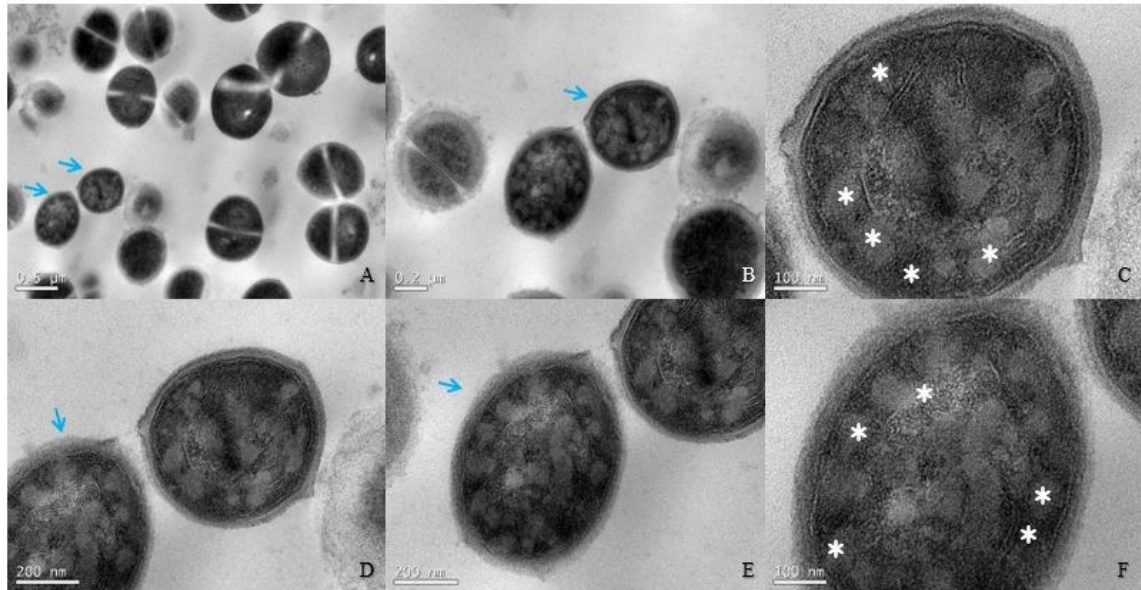
Figura 17 Seções ultrafinas de *S. aureus* ATCC 25923, expostas a 2 CIM da NE-ML por 4 h.



Setas brancas indicam invaginações da membrana plasmática.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 18 Seções ultrafinas de *S. aureus* ATCC 25923 expostas a 2 CIM da NE-ML por 4 h.

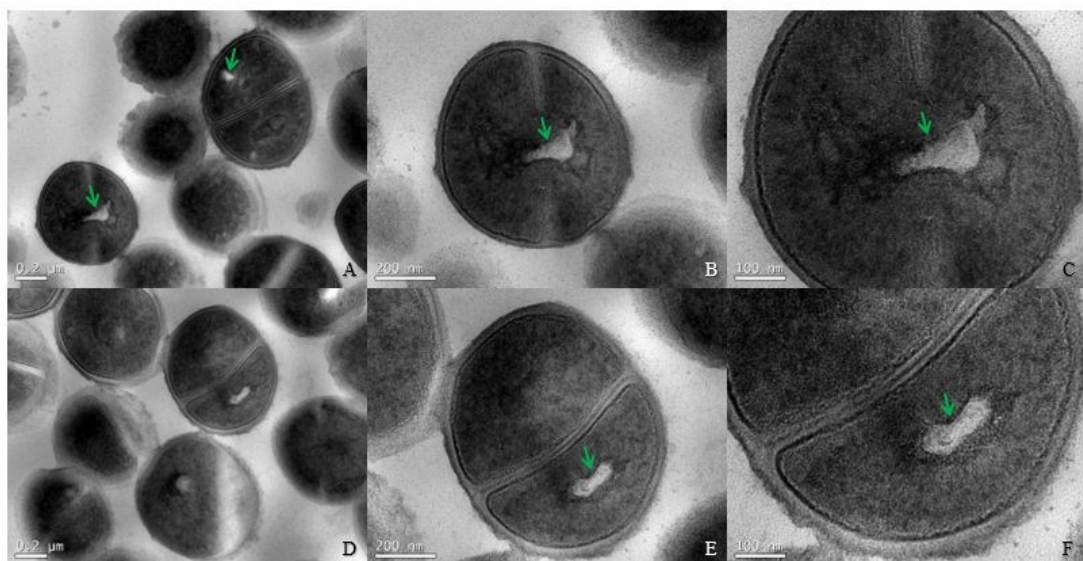


Setas azuis indicam células com desorganização na região intracelular; * indicam áreas eletrotransparentes no citoplasma.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A região central da célula apresenta de forma mais pronunciada o vacúolo eletrotransparente, que também apresenta aumento de tamanho (Figura 19, A-F). Algumas áreas da membrana plasmática perdem a definição.

Figura 19 Seções ultrafinas de *S. aureus* ATCC 25923 expostas a 2 CIM da NE-ML por 4 h.

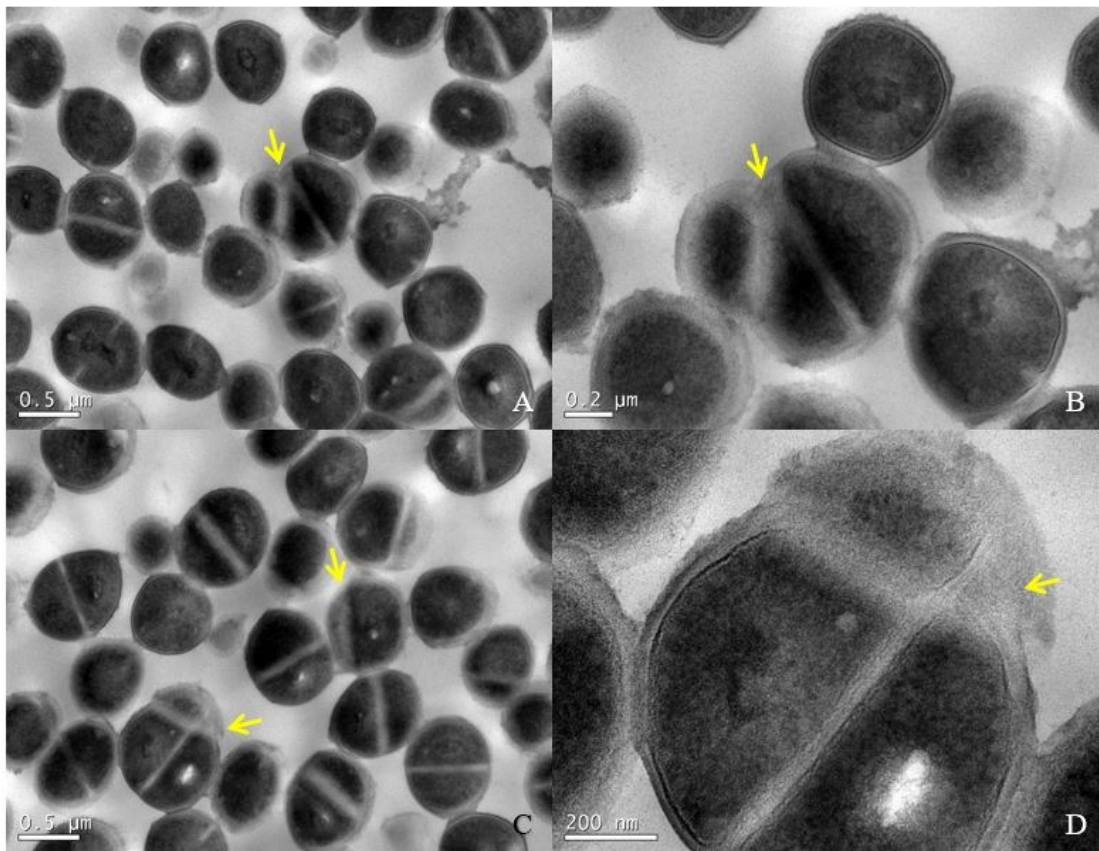


Setas verdes indicam os vacúolos eletrotransparentes na região do citoplasma.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No grupo tratado com 2 CIM da NE-ML também foi perceptível a presença de alterações e desorganização no padrão de divisão celular, em que as células se mostraram muito agrupadas (Figura 20, A-C). Além disso, algumas células filhas parecem perder sua função/estrutura e os septos de divisão celular se apresentam desalinhados e com material de baixa densidade (Figura 20, B e D), indicando que as áreas de formação septais são afetadas pela NE-ML.

Figura 20 Seções ultrafinas de *S. aureus* ATCC 25923 expostas a 2 CIM da NE-ML por 4 h.

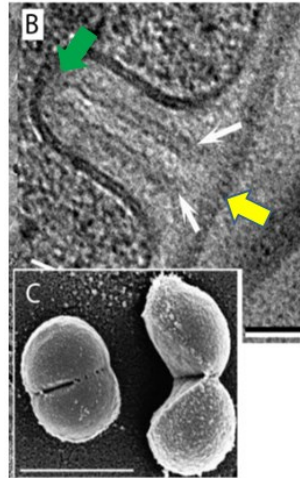


Setas amarelas indicam alterações no padrão de divisão celular, os quais encontram-se desalinhados e com material eletrotransparente.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As fases iniciais de crescimento e divisão celular bacteriana são marcadas pela septação, processo em que há intrusão coordenada da membrana citoplasmática, peptidoglicano e parede celular no citoplasma da região centrípeta da célula (TOUHAMI; JERICHO; BEVERIDGE, 2014; PAUL et al., 1995).

Figura 21 Início do processo de em em *S. aureus* (B) e células em processo de divisão celular (C).



Seta amarela indica parede celular da célula mãe; seta verde indica a membrana lipídica que definirá as bordas da placa septal e setas brancas indicam duas camadas que se formam nas células filhas.

Fonte: Adaptado de Erickson (2017).

Em células bacterianas normais, a parede celular contendo peptidoglicano da célula mãe permanece ao lado de fora da célula (figura 21, seta amarela) e uma nova parede de peptidoglicano cresce na região septal para as células filhas, identificado por duas zonas de alta densidade (figura 21, setas brancas). Assim, a membrana lipídica definirá as bordas da placa septal (figura 21, seta verde) e o material do peptidoglicano das células filhas formam a parede celular externa das células filhas, que são fundidas ao peptidoglicano da parede externa da célula mãe, durante a formação do septo (seta amarela) (ERICKSON, 2017).

Para que as bactérias se proliferem, garantindo que uma célula se divida em duas células filhas é necessário que elas passem por ciclos consecutivos de crescimento e divisão celular, coordenando processos de replicação de DNA, segregação de cromossomos novos, síntese de novas paredes celulares, atingindo a divisão celular. Em *S. aureus*, a replicação do DNA e a síntese de peptidoglicano envolvem proteínas e complexos protéicos de importante função na regulação dos processos de divisão celular bacteriana bem sucedidos (BARBUTI et al., 2023).

Ao entrar em contato com a NE-ML, a replicação de DNA celular pode ter sido perturbada, a segregação cromossômica pode ter sido afetada, ou até mesmo as enzimas envolvidas na síntese de peptidoglicano envolvido na formação e divisão da parede transversal septal podem ter sido perturbados, interferindo no processo de divisão celular bacteriana bem sucedido. Tal hipótese necessita de maiores investigações envolvendo a

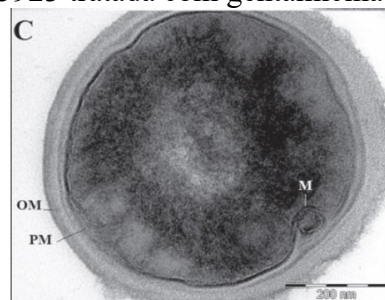
análise cromossômicas para averiguar a ação da NE-ML em tais estruturas, direcionando alvos promissores à ação na nanoformulação.

Em nosso estudo, apesar das células aparentemente apresentarem uma estrutura “normal”, a membrana plasmática e parede celular são afetadas, levando a formação de invaginações na membrana para o interior celular, e espessamento da parede em algumas regiões, formando uma espécie de cavitação.

Alguns peptídeos antimicrobianos como gramicidina S (GS) e peptidil-glicilleucina-carboxiamida (PGLa) foram capazes de interagir com as membranas bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*. Foi inferido que as moléculas podem aumentar a permeabilidade da membrana e penetrar na membrana externa com expansão da bicamada e desestabilizar a membrana interna, diminuindo a capacidade bacteriana de regulação da pressão de turgor em meio de baixa força iônica (HARTMANN et al., 2010).

Efeitos semelhantes foram encontrados em estudo que avaliou a formação de mesossomas em *S. aureus* exposta aos antibióticos com diferentes modos de ação, *i.e.*, vancomicina, oxacilina, amicacina, gentamicina e ciprofloxacina (RAJ; HING, 2007). As bactérias tratadas com gentamicina (figura 22) apresentaram um padrão de formação de mesossomo próximo ao padrão das invaginações encontradas em nosso estudo com as bactérias tratadas com a NE-ML. Os autores pontuam que essas formações provavelmente são resultado de um mecanismo de defesa das bactérias expostas aos antibióticos.

Figura 22 *S. aureus* ATCC 25923 tratada com gentamicina (C) com incubação overnight.



M: mesossomos; PM: membrana plasmática; OM: parede celular.

Fonte: RAJ et al., 2007.

A gentamicina é um antibiótico bactericida da classe aminoglicosídeo, com capacidade de ligação irreversível à subunidade ribossomal 30s, o que afeta a translação do mRNA. Isso faz com que aminoácidos incorretos sejam incorporados à cadeia polipeptídica, originando proteínas defeituosas. A morte bacteriana pode ocorrer, pois estas moléculas

podem afetar a função da membrana celular e levar ao extravasamento de sódio, potássio, aminoácidos e outros constituintes celulares (SPINOSA; GÓRNIAK; BERNARDI, 2017).

Foi demonstrado que alguns antibióticos bactericidas como aminoglicosídeos podem apresentar um mecanismo de morte celular sugerido como uma estimulação da produção de radicais hidroxilas, altamente nocivas às bactérias. O ferro interno de aglomerados de ferro-enxofre é utilizado para promoção e formação dos radicais hidroxilas, mediadas por Fenton, em função da depleção transitória de NADH (KOHANSKI et al., 2007).

Ainda não se compreende completamente como os efeitos de muitos antibióticos podem inibir processos moleculares que resultam em morte celular. Existem evidências que a morte bacteriana ocorre por mecanismos altamente complexos e regulados, muito semelhantes ao mecanismo de apoptose em células eucariontes (BAYLES, 2007).

As bactérias possuem capacidade de levar a sua própria morte (morte celular programada, DCP), como um importante mecanismo de desenvolvimento de uma população bacteriana para sustentar a sobrevivência celular, *e.g.*, colônias, biofilmes e agregados celulares. A comunicação nestes ambientes é modulada pela detecção de quorum (QS), em resposta à mudança de densidade celular. Além de sincronizar a expressão gênica da colônia, a QS também pode ativar as vias de morte bacteriana, com finalidade de controle (ALLOCATI et al., 2015).

A maioria das bactérias contém *loci* TA, organizados em operon com dois genes que codificam uma toxina estável, que interrompe um processo celular essencial e uma antitoxina, instável, que evita sua toxicidade. O sistema toxina-antitoxina é um complexo estável, que inibe a atividade da toxina em condições normais. Em condições de estresse, como quando expostas a antibióticos, as antitoxinas são degradadas e a toxina se liga ao seu alvo, interrompendo o crescimento celular ou levando à morte celular (ALLOCATI et al., 2015).

Alguns estudos apontam que a autólise de *S. aureus* pode ocorrer nos ambientes de biofilmes, possivelmente regulada pelo operon *cidABC e lrgAB*, mas os mecanismos ainda são pouco compreendidos (SADYKOV; BAYLES, 2012). Há liberação de eDNA que controla a atividade do peptidoglicano hidrolase, através de proteínas CidA e LrgA. Tais proteínas são análogas às holinas e antiholinas do bacteriófago, que controlam morte celular mediada por bacteriófagos e lise (BAYLES, 2007). A lise bacteriana de subpopulações tem papel importante para o desenvolvimento e estabilidade do biofilme, com liberação de DNA genômico que se incorpora à matriz do biofilme, importantes para adesão intracelular.

A NE-ML já foi avaliada frente à biofilmes de *S. aureus* MRSA *in vitro* (PINHEIRO MACHADO et al., 2020). Ela apresentou capacidade de reduzir mais de 64% da massa

celular e conseguiu interromper a integridade da estrutura do biofilme. A formulação também foi capaz de remover o biofilme previamente formado ao longo de 48 h.

Desta maneira, sugerimos a hipótese de que a NE-ML causa alterações nas ultraestruturas da membrana plasmática e citosol, que se estendem para a parede celular. Tais danos estruturais se correlacionam com a permeabilização e alteração da integridade das estruturas celulares, o que explicaria o vazamento de eletrólitos e constituintes intracelulares observados em nossa investigação. O aumento da concentração da NE-ML estendeu os danos celulares ao processo de divisão bacteriana, observada pela presença de células filhas desorganizadas, com padrões de septação alterados. Não se pode afirmar que ao expor as bactérias à NE-ML, a formulação estimule o processo de morte celular programada de *S. aureus*, necessitando de maiores investigações que avaliem a exposição das bactérias ao produto e sua relação com os operons *cidABC* e *lrgAB*, envolvidos no processo de autólise celular.

6.8 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS E AMINOGLICOSÍDEOS PELA INTERAÇÃO COM A NE-ML

A determinação da CIM dos antimicrobianos oxacilina, penicilina e gentamicina para cada cepa padrão e isolado de *S. aureus* é apresentada na tabela 11.

Tabela 11 Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dos antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeo contra as cepas padrão de *S. aureus* e isolados bacterianos, necessário para a determinação da faixa de concentração dos antimicrobianos comerciais para o ensaio checkerboard.

<i>S. aureus</i>	Antibiótico	CIM $\mu\text{g}/\text{mL}$	CIM equivalente ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Ponto de corte (CLSI, 2006)	
ATTC 25923	OXA	0,25	≤ 2	Sensível
ATCC 33592	OXA	0,50	≤ 2	Sensível
O1	OXA	0,25	≤ 2	Sensível
P1	PEN	0,5	$\geq 0,12$	Resistente
P2	PEN	0,25	$\geq 0,12$	Resistente
G1	GEN	0,5	≤ 4	Sensível
G2	GEN	1	≤ 4	Sensível

OXA: oxacilina. PEN: penicilina; GEN: gentamicina.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A categoria sensível se refere a uma infecção que pode ser tratada com a dose do antibiótico recomendado para o tipo de infecção e espécie infectante, enquanto cepas consideradas resistentes não são inibidas por concentrações sistêmicas atingíveis dos antimicrobianos em regimes terapêuticos normais (CLSI, 2006). Os isolados bacterianos resistentes foram selecionados com a finalidade de avaliar a capacidade da associação da NE-ML à penicilina de reverter a resistência bacteriana.

A resistência à meticilina é definida como uma CIM de oxacilina ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$. No presente estudo, podemos observar que a CIM da cepa padrão *S. aureus* MRSA ATCC 33592, foi 0,5 $\mu\text{g/mL}$. A variação de resistência dentro de uma mesma população de cepas MRSA talvez possa explicar essa inconsistência. Mesmo quando as células de uma cultura pura possuem a capacidade de expressar resistência aos antibióticos, elas podem exibir comportamentos não uniformes devido a fatores como condições de cultivo, tempo e temperatura de incubação. Se estima que apenas uma célula em 10^4 a 10^8 apresente resistência detectável em resposta à oxacilina (BABEL; DECKER, 2008).

A partir da determinação da CIM da NE-ML em pH 7,4 para cada cepa padrão e isolados de *S. aureus* de 5% de NE-ML (v/v), equivalente a 125 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de macela nanoencapsulado (cf. seção 6, “resultados e discussão”, item 6.1) e pela da determinação da CIM dos antimicrobianos comerciais frente as cepas padrão e isolados de *S. aureus* (tabela 11), foi possível delinear as faixas de concentração dos antibióticos utilizados no ensaio *checkerboard* (cf. seção 5, “material e métodos”, item 5.10).

Apesar da metodologia *checkerboard* ser padronizada, os resultados obtidos podem sofrer significativa diferença, a depender do método de interpretação utilizado (BONAPACE et al., 2002). Portanto, a partir da determinação do índice de concentração inibitória fracionada (IFIC/ Σ FIC) para cada poço da microplaca, utilizou-se duas metodologias distintas “Média FIC” e “Índice FIC mais baixo” para interpretação dos dados obtidos.

A tabela 12 apresenta os resultados da modulação entre a associação da NE-ML e oxacilina (contra cepas ATCC 25923, ATCC 33592, e isolado O1), entre NE-ML e penicilina (contra isolados P1 e P2) e entre NE-ML e gentamicina (contra isolados G1 e G2), de acordo com duas metodologias distintas de interpretação de FIC: Média FIC (EUCAST, 2000) e Índice FIC mais baixo (LEBER, 2016).

Tabela 12 Interação da NE-ML com antimicrobianos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos, a partir das interpretações do IFIC/ Σ FIC pelo método Média FIC e Índice FIC mais baixo.

<i>S. aureus</i>	Média FIC		Índice FIC mais baixo	
	(EUCAST, 2000)		(LEBER, 2016)	
ATCC 25923	1,68±0,00	IND	1,12±0,00	IND
ATCC 33592	1,23±0,00	IND	1,06±0,00	IND
O1	2,37±0,27	ANT	1,06±0,09	IND
P1	1,05±0,20	IND	0,56±0,00	IND
P2	2,44±0,13	ANT	0,87±0,35	IND
G1	1,36±0,00	IND	0,56±0,00	IND
G2	0,59±0,00	ADT	0,31±0,00	SIN

SIN: sinergia; IND: indiferença; ANT: antagônico; ADT: aditivo.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em um estudo comparativo entre quatro diferentes metodologias de interpretação de *checkerboard*, os autores constataam uma ampla variedade de resultados, com a probabilidade de 83% de detectar sinergia pelo método Índice FIC mais baixo, enquanto para o método da Média FIC este valor caiu para 40% (BONAPACE et al., 2002).

De maneira geral, as combinações testadas pelos dois métodos de interpretação resultaram em interações indiferentes entre a NE-ML e os antibióticos. As interações indiferentes são assim chamadas pois o efeito da combinação em teste é igual ao efeito do antimicrobiano mais ativo (EUCAST, 2000).

Uma interação sinérgica entre NE-ML e gentamicina contra o isolado G2 foi observado pelo método Índice FIC mais baixo. No poço contendo o índice FIC mais baixo a concentração da NE-ML diminui de 125 $\mu\text{g/mL}$ para 7,8 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a concentração da gentamicina caiu de 1 $\mu\text{g/mL}$ para 0,25 $\mu\text{g/mL}$. Quando o mesmo isolado (G2) é interpretado pela metodologia Média FIC, é categorizado como uma interação aditiva entre a NE-ML e a gentamicina. O outro isolado avaliado frente à associação de NE-ML e gentamicina apresentou atividade indiferente.

Na aditividade, o efeito da combinação dos antimicrobianos é igual à soma dos efeitos individuais. No sinergismo, os efeitos da combinação excederão a soma dos efeitos dos compostos individuais (EUCAST, 2000). Apesar das interações aditivas apresentarem diminuição de concentrações, o limiar que separa a classificação aditiva de sinérgica é muito baixa. As interações sinérgicas são a principal busca para a terapia combinada de

antimicrobianos (YANG et al., 2017) e geralmente podem ocorrer com fármacos de uma mesma classe ou que tenham como alvo o mesmo processo.

Resultados antagônicos também foram encontrados com a interpretação Média FIC, nos isolado O1 e P2. Mecanismos relacionados a interações antagônicas não são totalmente elucidados. Uma das possíveis explicações é de que a grande maioria destas interações ocorrem pela modulação das concentrações intracelulares do fármaco, *i.e.*, a interação a nível fármaco-alvo, onde um antimicrobiano inibe a captação ou promove o efluxo do outro fármaco, diminuindo sua concentração intracelular (BROCHADO et al., 2018).

Ao longo desta pesquisa, levantamos evidências que nos levam a inferir que a NE-ML possui ação na membrana plasmática bacteriana, além de causar danos ao citosol e parede celular. Tais fatos resultam em perturbações na permeabilização da célula (cf. seção “resultados e discussão”, item 6.5 a 6.7)

Essa informação, pode nos dar indícios sobre o potencial sinérgico/aditivo entre a associação da NE-ML com a gentamicina (isolado bacteriano G2), caracterizada pela utilização de doses mais baixas de ambos os antimicrobianos. Os efeitos da nanoformulação sobre a integridade e permeabilidade da membrana plasmática bacteriana possivelmente auxiliaram na entrega do antibiótico gentamicina no citoplasma bacteriano, permitindo sua ação em alvos intracelulares. Os antimicrobianos aminoglicosídeos, como a gentamicina, se ligam à unidade 30s ribossomal e interferem na síntese de proteínas de importante papel nas estruturas celulares e constituintes bacterianos, afetando funções estruturais essenciais à função e viabilidade da bactéria (SPINOSA, GÓRNIK, BERNARDI, 2017).

Por outro lado, os antimicrobianos beta-lactâmicos penicilina e oxacilina são responsáveis por interromper a formação da parede celular bacteriana ao se ligarem de forma covalente nas proteínas essenciais de ligação à penicilina (PBPs) (BUSH; BRADFORD, 2016). As interações indiferentes resultadas das associações entre a NE-ML e os antibióticos beta-lactâmicos possivelmente se deram porque estes antimicrobianos agem alterando sua captação ou promovendo o efluxo entre eles.

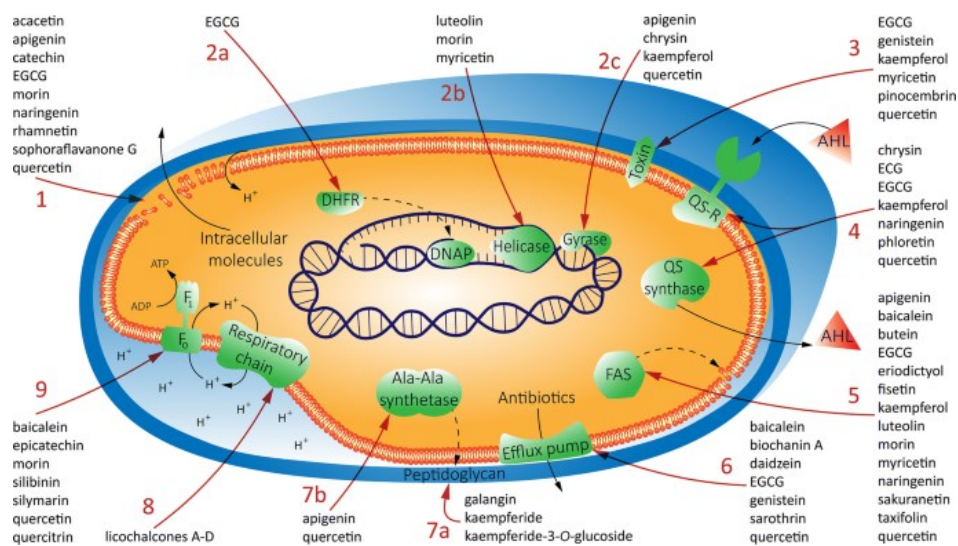
A inexistência de conhecimento, antecedente a esta pesquisa, sobre os mecanismos de ação da NE-ML dificultaram a escolha de classes antimicrobianas, que possivelmente resultariam em maiores interações sinérgicas com a NE-ML. Apesar disso, sabe-se que os compostos fitoquímicos majoritários do extrato de macela (*Achyrocline satureioides*) que compõe a NE-ML em estudo são os flavonoides 3-O-metilquercetina, achyrobichalcona (ACB), quercetina e luteolina (PINHEIRO MACHADO et al., 2020).

Os compostos flavonoides são a classe primária de polifenóis, com mais de 8000 moléculas descritas e diferentes atividades biológicas. Os mecanismos de ação antimicrobiana destes compostos ainda não são totalmente elucidados, mas são relacionados à presença de grupos hidroxila em locais específicos nos anéis aromáticos (XIE et al., 2015).

As atividades antimicrobianas descritas para diferentes compostos flavonoides se dão por diferentes mecanismos de ação: (i) membrana celular (por inibição da função, inibição de porinas, alteração de permeabilidade); (ii) inibição da síntese de ácido nucléico; (iii) inibição no metabolismo energético; (iv) inibição da fixação e formação de biofilme e outros (YUAN et al., 2021; XIE et al., 2015).

A figura 23 sintetiza os mecanismos de ação já descritos de alguns flavonoides.

Figura 23 Mecanismos de ação antimicrobiana de alguns compostos flavonoides.



Fonte: Górnaiak; Bartoszewski; Króliczewski, 2019.

Os resultados obtidos neste estudo nos dão indícios de que, de forma geral, a NE-ML em associação com antibióticos beta-lactâmicos gera interações indiferentes e sua associação com aminoglicosídeos, *i.e.*, gentamicina, apresentou um resultado promissor de interação sinérgica/aditiva contra um isolado bacteriano de *S. aureus*. É necessário ampliar as avaliações com outras classes de antibióticos e com diferentes mecanismos de ação para confirmar seu padrão de modulação.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- A NE-ML apresentou ação antimicrobiana nos diferentes pH testados.
- Em pH 7,4 e 6,0 a NE-ML possui uma CIM de 5% (v/v) equivalente a 125 µg/mL de extrato de macela encapsulado, contra todos os microrganismos testados.
- Em pH 5,0 a NE-ML possui uma CIM de 2,5% (v/v) equivalentes a 62,5 µg/mL de extrato de macela encapsulado, contra a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923.
- Modelos matemáticos se mostram como boas ferramentas para avaliar a dinâmica populacional de *S. aureus* ATCC 25923, ao longo do tempo e em diferentes pH.
- Em doses subinibitórias de 0,5 CIM a NE-ML não apresentou atividade antimicrobiana satisfatória, ao longo de 24 h, que justifique seu emprego clínico.
- Sugere-se que a frequência de administração da NE-ML esteja próxima a um intervalo de tempo de 8 h, sendo necessário sua reaplicação/administração após este período.
- A NE-ML é capaz de evitar o crescimento bacteriano ao longo de 24 h, em concentração equivalente a 2 CIM, em pH 7,4 e 5,0, sendo considerada bactericida em pH 7,4.
- Através da modelagem, se constatou que uma menor concentração de NE-ML em pH 5,0 (58,2 µg/mL) foi capaz de levar a diminuição de 50% da redução populacional máxima, quando comparada com as concentrações necessárias para o mesmo efeito inibitório em pH 7,4 (134,9 µg/mL) e pH 6,0 (58,2).
- É possível inferir que a NE-ML, em sua concentração 2 CIM, seja capaz de apresentar boa atividade antimicrobiana em ambientes intracelulares.
- A NE-ML em contato com *S. aureus* promove a liberação de eletrólitos e outros componentes intracelulares como proteínas.
- A associação da NE-ML com antimicrobianos beta-lactâmicos gera interações indiferentes.
- A associação da NE-ML com aminoglicosídeos, *i.e.*, gentamicina, apresentou resultado promissor com uma potencial interação sinérgica/aditiva contra um isolado bacteriano de *S. aureus*, sendo um achado importante pois permite o uso de doses mais baixas dos antimicrobianos, e que necessita de maiores investigações.

- A NE-ML tem capacidade agir nas estruturas da membrana plasmática bacteriana, afetando citosol e parede celular. Esta hipótese é apoiada na correlação com a permeabilização e integridade das estruturas celulares, o que explicariam o vazamento de eletrólitos e constituintes intracelulares observados.
- O aumento da concentração de NE-ML aumentou os danos às células e, com o passar do tempo, se estende à parede celular.
- Há indícios de que a NE-ML provoque danos no processo de divisão bacteriana.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa propôs a avaliação de incertezas relacionadas à viabilidade da nanoemulsão de macela (NE-ML) (BR 10 2021 008630 0), quanto aos seus mecanismos de ação, efeito antimicrobiano em diferentes condições de pH e sua capacidade modulatória antimicrobiana em associação à antimicrobianos comerciais. Atualmente, o nível de maturidade, também conhecido como TRL, desta tecnologia é TRL-2, ou seja, a mesma ainda está em desenvolvimento e aperfeiçoamento laboratorial.

O TRL (Technology Readiness Level) se relaciona com o nível de maturidade atingida por uma nova tecnologia e indica o quão longe ela está do seu potencial uso e aplicação, para a qual foi desenvolvida (ARNOUTS et al., 2022). Para que a NE-ML possa avançar no seu grau de maturidade, é de extrema importância a obtenção de evidências substanciais sobre suas características e comportamentos *in vitro* que contribuam e alavanquem estudos *in vivo* de forma segura.

Dessa forma, os estudos realizados no presente estudo tinham como objetivo gerenciar incertezas relativas a esta tecnologia, visando subsidiar o avanço na sua maturidade tecnológica. Os estudos realizados demonstraram que a NE-ML apresentou estabilidade em termos de concentração inibitória mínima em pH 7,4 e 6,0, além de ter aumentado sua atividade antimicrobiana em meio acidificado (pH 5,0). A nova formulação também mostrou ter efeito sobre a permeabilidade da membrana celular, a qual pode ser verificada com a liberação de pequenos eletrólitos e constituintes de material absorvente em 260 nm, como proteínas. As micrografias das ultraestruturas bacterianas evidenciam a ação da NE-ML com as ultraestruturas da membrana plasmática, citosol e se estendem à parede celular de *S. aureus*. Tais alterações são relacionadas com a permeabilização e integridade das estruturas celulares, explicando o vazamento de eletrólitos e constituintes intracelulares, os quais foram detectados nos ensaios de condutividade elétrica e *screening* de material absorvente à 260 e 280 nm. Pode-se verificar também, que o aumento da concentração da NE-ML estendeu os danos celulares ao processo de divisão bacteriana, observada pela presença de células filhas desorganizadas, com padrões de septação alterados.

Tendo em vista esses resultados, é necessário averiguar a ação e interação da NE-ML com o material genético bacteriano, analisando se ela é reversível ou não, como acontece com diferentes classes de antibióticos, *e.g.*, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Futuramente, a realização de um ensaio de exposição bacteriana à NE-ML, seguida da interrupção do tratamento e avaliação das ultraestruturas bacterianas, poderiam indicar se as bactérias

recuperam sua atividade enzimática normal com retomada do seu crescimento e reprodução, indicando ação sobre o material genético e divisão celular.

Após a análise das micrografias, uma nova pergunta emergiu. A NE-ML poderia desencadear a morte celular programada de *S. aureus*? Com o aumento da concentração da NE-ML, ocorreu o surgimento de vacúolos eletrotransparentes na região do citosol bacteriano, sem alterações significativas das estruturas de membrana plasmática e parede celular, compatíveis com a morte celular. Esses vacúolos podem representar compartimentos com produtos de degradação metabólica ou organelas celulares modificadas. Desse modo, parece-nos pertinente prosseguir com a avaliação da NE-ML para verificar se o produto vacuolar eletrotransparente encontrado possui correlação com o sistema toxina-antitoxina bacteriano, indicando processos de morte celular programada bacteriana. Uma abordagem adicional seria investigar a interação da NE-ML com os operons *cidABC* e *lrgAB*, que já foram descritos no processo de autólise celular em *S. aureus* (SADYKOV; BAYLES, 2012).

As nanoformulações surgem como uma estratégia promissora no combate à resistência antimicrobiana. A nanoformulação NE-ML consiste na nanoencapsulação do extrato bruto de macela, o qual é uma matriz complexa e que, portanto, provavelmente possui múltiplos mecanismos de ação. Essa sinergia entre os compostos pode resultar em uma eficácia antimicrobiana amplificada, se comparada à administração individual dos mesmos. A presença de vários compostos em uma única nanopartícula demandaria múltiplas mutações genéticas simultâneas por parte das bactérias, necessário para superar o efeito do produto (PELGRIFT; FRIEDMAN, 2013).

A resistência antimicrobiana é um desafio de saúde global e complexo, sendo crucial considerá-lo. As bactérias têm uma notável capacidade de adquirir resistência, enquanto os agentes antimicrobianos enfrentam limitações contra microrganismos resistentes. Portanto, é de extrema urgência desenvolver novas abordagens para enfrentar esse problema.

Dado que a bovinocultura leiteira é um dos setores que mais utiliza antibióticos na produção animal, é sensato direcionar esforços para o desenvolvimento de alternativas ecológicas para esses sistemas. É necessário avançar nas pesquisas relacionadas à NE-ML, aperfeiçoando sua formulação para aplicação de maneira eficaz e relevante.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A. G.; VILLA, T. G.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CAÑAS, B.; SÁNCHEZ-PÉREZ, A.; CALO-MATA, P.; CARRERA, M. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. **Toxins** (Basel), v. 12, n. 9, p. 537, 2020.
- AIRES-DE-SOUSA, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 6, p. 373–380, 2016
- ALEXANDER, E. H.; HUDSON, M. C. Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 3-4, p. 361-6, 2001.
- ALGHARIB, S. A.; DAWOOD, A.; XIE, S. Nanoparticles for treatment of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Drug Deliv**, v. 27, n. 1, p. 292-308, 2020.
- ALLOCATI, N.; MASULLI, M.; DI ILIO, C.; DE LAURENZI, V. Die for the community: an overview of programmed cell death in bacteria. **Cell Death Dis**, 6(1):e1609, 2015.
- AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; LEIVA, J.; OTEIZA, C.; PÉREZ, M.; ALABART, J. L.; HERNÁNDEZ-YAGO, J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **J Antimicrob Chemother**, v. 44, n. 1, p. 43-55, 1999.
- ANAND, U.; JACOBO-HERRERA, N.; ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N. A Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. **Metabolites**; v. 9, n. 11, p. 258, 2019.
- ANJUM, M. F.; MARCO-JIMENEZ, F.; DUNCAN, D.; MARÍN, C.; SMITH, R. P.; EVANS, S. J. Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* From Animals and Animal Products in the UK. **Front Microbiol**. v. 10, p. 2136, 2019.
- Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **Lancet**, v. 399, n. 10325, pp. 629–55, 2022.
- ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. **Pharm Res.**, v. 28, n. 5, p. 978-85, 2011.
- ANTON, N.; BENOIT, J.P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal of Controlled Release**. v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.
- ARNOUITS, S.; BROWN, S.; ARRIBA, M. L.; DONABEDIAN, M.; CHARLIER, J. Technology Readiness Levels for vaccine and drug development in animal health: From discovery to life cycle management. **Front. Vet. Sci.**, v. 9, 2022.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Anim Health Res Rev.**, v. 21, n. 1, p. 36-49, 2020.

- AVANCINI, C.; WIEST, J.; DALL'AGNOL, R.; HAAS, J.; VON POSER, G. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 894-899, 2008
- BABEL, B. S.; DECKER, C. F. Microbiology and Laboratory Diagnosis of MRSA. **Disease-a-Month**, 5(12):769-773, 2008.
- BARBUTI, M. D.; MYRBRÅTEN, I. S.; MORALES ANGELES D.; KJOS, M. The cell cycle of *Staphylococcus aureus*: An updated review. **Microbiologyopen**, 12(1):e1338, 2023.
- BARCIA-MACAY, M.; SERAL, C.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; TULKENS, P. M.; VAN BAMBEKE, F. Pharmacodynamic evaluation of the intracellular activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a model of THP-1 macrophages. **Antimicrob Agents Chemother**, 50(3):841-51, 2006.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y. H. ; ZADOKS, R. N. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. **Journal of Dairy Science**. 89(6):1877-1895, 2006.
- BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nat Rev Microbiol**, 5(9):721–726, 2007.
- BAYR, H. M. D. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12, p. S498-S501, 2005.
- BENGTSSON, B.; GREKO, C. Antibiotic resistance—consequences for animal health, welfare, and food production. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v, 119, n. 2, p. 96-102, 2014.
- BIANCHI, S. E.; KAISER, S.; PITTOL, V.; DONEDA, E.; DE SOUZA, K. C.; BASSANI, V. L. Semi-preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. by high-performance counter-current chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 30, n. 2, p. 182–192, 2019.
- BONAPACE, C.R.; BOSSO, J.A.; FRIEDRICH, L.V.; WHITE, R.L. Comparison of methods of interpretation of *checkerboard* synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 44(4):363-366, 2002.
- BOTH, J. M.; AVANCINI, C. A.; SPANIOL, B.; PETROVICK, P. R. Atividade desinfetante anti-*Staphylococcus aureus* meticilina resistentes e compostos flavonóides em *Achyrocline satureioides* Lam. (macela). **Rev. cuba. plantas med.**, v. 21, n. 4, p. 1-12, 2016.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**. 280(1-2):241-251, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROCHADO, A. R.; TELZEROW, A.; BOBONIS, J.; BANZHAF, M.; MATEUS, A.; SELKRIG, J.; HUTH, E.; BASSLER, S.; BEAS, J. Z.; ZIETEK, M.; NG, N.; FOERSTER, S.; EZRATY, B.; PY, B.; BARRAS, F.; SAVITSKI, M. M.; BORK, P.; GÖTTIG, S.; TYPAS, A. Species-specific activity of antibacterial drug combinations. **Nature**, v. 559, n. 7713, p. 259-263, 2018.

BROUILLETTE, E.; TALBOT, B.; MALOUIN, F. The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. **Infect Immun**, v. 71, n. 4, p. 2292-5, 2003.

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

BULDAIN, D.; CASTILLO, L. G.; MARCHETTI, M. L.; LOZANO, K. J.; BANDONI, A.; MESTORINO, N. Modeling the Growth and Death of *Staphylococcus aureus* against Melaleuca armillaris Essential Oil at Different pH Conditions. **Antibiotics (Basel)**, v. 10, n. 2, 2021.

BURMEISTER, A. Horizontal Gene Transfer. **Evol Med Public Health**, v. 2015, n. 1, p.193-4, 2015.

BUSH, K.; BRADFORD, P. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.

CAMPOS, B.; PICKERING, A. C.; ROCHA, L. S.; AGUILAR, A. P.; FABRES-KLEIN, M. H.; MENDES, T. A. O.; FITZGERALD, J. R.; RIBON, A. O. B. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. **BMC Veterinary Research.**, v. 18, n. 1, p. 115, 2022.

CAMPOS, F. L.; VALENTE, P.; ETHUR, E. M.; AVANCINI, C. A. Atividade desinfetante do extrato hidroalcoólico bruto de *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) sobre *Candida spp.* isoladas em situações-problema de mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 4, p. 327-333, 2016.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 1, p. 11-48, 2013.

CECCHINI, M.; PAOLONI, C.; CAMPRA, N.; PICCO, N.; GROSSO, M.; SORIANO PEREZ, M.; ALUSTIZA, F.; CARIDDI, N.; BELLINGERI, R. Nanoemulsion of *Mintostachys verticillata* essential oil. In-vitro evaluation of its antibacterial activity. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. e05896, 2021.

CHATTERJEE, S. S.; OTTO, M. Improved understanding of factors driving methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic waves. **Clin Epidemiol**, v. 5, p. 205-17, 2013.

CHEN, J.; ZHOU, H.; HUANG, J.; ZHANG, R.; RAO, X. Virulence alterations in *Staphylococcus aureus* upon treatment with the sub-inhibitory concentrations of antibiotics. **J Adv Res.** 31:165-175, 2021.

CHEUNG, G. Y.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CHOW, L. K. M.; GHALY, T. M.; GILLINGS, M. R. A survey of sub-inhibitory concentrations of antibiotics in the environment. **Journal of Environmental Sciences**, 99:21-27, 2021.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility tests supplement M100S16**. Wayne, PA, USA. 2006

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution microbial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard—7th edition M7-A7. Wayne, PA, USA. 2006

COLLIGNON, P. J.; MCEWEN, S. A. One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Trop. Med. Infect. Dis**, v. 4., n. 2., p. 22, 2019.

COLLIGNON, P.; BEGGS, J. J.; WALSH, T. R.; GANDRA, S.; LAXMINARAYAN, R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 2, n. 9, p. e398-e405, 2018.

COLLIGNON, P. The Importance of a One Health Approach to Preventing the Development and Spread of Antibiotic Resistance. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 366, p. 19–36, 2013.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DE SOUZA, W. (ed.). **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. 3ª. Edição. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2011.

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102–108, 2007.

DIAO, W. R.; HU, Q. P.; ZHANG, H.; XU, J.G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, 35(1), 109–116, 2014.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol Mol Biol Ver**, 61(3):377-92, 1997.

ELBEHIRY, A.; AL-DUBAIB, M.; MARZOUK, E.; MOUSSA, I. Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and the potential toxicity in rats. **Microbiology Open**, 8(4): e00698, 2019.

ENGLER, C.; RENNA, M. S.; BECCARIA, C.; SILVESTRINI, P.; PIROLA, S. L.; PEREYRA, E. A. L.; BARAVALLE, C.; CAMUSSONE, C; M.; MONECKE, S.;

CALCINHO, L. F.; DALLARD, B. E. Differential immune response to two *Staphylococcus aureus* strains with distinct adaptation genotypes after experimental intramammary infection of dairy cows. **Microbial Pathogenesis**, v. 172, p. 105789, 2022.

EUCAST. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 9, p. 453-515, 2000.

EZZAT, A. M.; QUINTELA-BALUJA, M.; BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I.; CAAMAÑO-ANTELO, S.; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. **J Vet Med.**, v. 2014, p. 659801, 2014.

FANTATTO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; GAINZA, Y. A.; POLITI, F. A. S.; MESQUITA, L. M. S.; VILEGAS, W.; BIZZO, H. R.; MONTANARI JUNIOR, I.; PIETRO, R. C. L. R. Acaricidal and anthelmintic action of ethanolic extract and essential oil of *Achyrocline satureioides*. **Experimental Parasitology**, v. 236-237, p. 108252, 2022.

FENTON, M.; KEARY, R.; MCAULIFFE, O.; ROSS, R.; O'MAHONY, J.; COFFEY, A. Bacteriophage-Derived Peptidase CHAP(K) Eliminates and Prevents Staphylococcal Biofilms. **Int J Microbiol**, v. 2013, p. 625341, 2013.

FIORDALISI, S. A. L. **Potencial de produtos naturais no controle da mastite bovina: teor de fenólicos e flavonoides, atividade antimicrobiana e efeitos sobre células epiteliais mamárias bovina**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. Florianópolis, Santa Catarina. 2018. 141 p.

FITZGERALD, J. R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 4., p. 192-198, 2012.

FLORIO, J. C.; DE SOUSA, A. B.; GÓRNIK, S. L. Farmacocinética. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Sexta edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: RJ, 2017, p. 1420.

FRAUNHOLZ, M.; SINHA, B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: live-in and let die. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 2, p. 43, 2012.

FROST, L.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 9, p. 722-732, 2005.

GARLET, T. M. B. **Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul**. Santa Maria, RS: UFSM, PRE, 2019.

GARZONI, C.; KELLEY, W. L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 59-65, 2009.

- GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2507–2515, 2008.
- GOLD, H.; MOELLERING, R. C. Antimicrobial-Drug Resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 19, 1445-1453, 1996.
- GOLTZ, C.; ÁVILA, S.; BARBIERI, J. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 227–234, 2018.
- GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Curr Microbiol**, v. 72, n. 4, p. 377-82, 2016.
- GONÇALVES, G. G.; FERREIRA, M. I.; MING, L. C. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ALBUQUERQUE, U. P. et al. (eds.). In: **Medicinal and Aromatic Plants of South America**, Medicinal and Aromatic Plants of the World 5, Springer Nature, p. 81-88, 2018.
- GONZÁLEZ, M.; CAVALLO, L; BUDELLI, E., BARRIOS, S.; PÉREZ, N.; LEMA, P.; HEINZEN, H. Ultrasonic assisted extraction of *Achyrocline satureioides* Lam, D.C. (marcela) in aqueous media improves extraction yield and enhances selective bioactive extraction. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 29, p. 100819, 2022.
- GÓRNIAK, I.; BARTOSZEWSKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Ver*, 18:241–272, 2019.
- GRIGOR'EVA, A.; BARDASHEVA, A.; TUPITSYNA, A.; AMIRKHAPOV, N.; TIKUNOVA, N.; PYSHNYI, D.; RYABCHIKOVA, E. Changes in the Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Treated with Cationic Peptides and Chlorhexidine. **Microorganisms**, 8(12):1991, 2020.
- GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X.; KALTSATOSA, V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, b. 3, p. 245-259, 2001.
- HARTMANN, M.; BERDITSCH, M.; HAWECKER, J.; ARDAKANI, M. F.; GERTHSEN, D.; ULRICH, A. S. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. **Antimicrob Agents Chemother**, 54(8):3132-42, 2010.
- HARWANSH, R. K.; DESHMUKH, R.; RAHMAN, M. A. Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 51, p. 224-233, 2019.
- HATAMI, T.; CAVALCANTI, R. N.; TAKEUCHI, T. M.; MEIRELES, M. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) flowers: Kinetic, experiments and modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 65, p. 71– 77, 2012.

HAXHIAJ, K.; WISHART, D.; AMETAJ, B. Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers. **Dairy**, v. 3, n. 4, p. 722-746, 2022.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. Economic aspects of mastitis: New developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16-23, 2011.

HOLZSCHUH, M. H.; GOSMANN, G.; SCHNEIDER, P. H.; Schapoval, E. E.; Bassani, V. L. Identification and stability of a new bichalcone in *Achyrocline satureioides* spray dried powder. **Pharmazie**, v. 65, n. 9, p. 650-656, 2010.

HUSSAIN, M.; HAGGAR, A.; HEILMANN, C.; PETERS, G.; FLOCK, J.I.; HERRMANN, M. Insertional Inactivation of eap in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Confers Reduced Staphylococcal Binding to Fibroblasts. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2933-2940, 2002.

HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

JAVED, S.; MCCLURE, J.; SYED, M.; OBASUYI, O.; ALI, S.; TABASSUM, S.; EJAZ, M.; ZHANG, K. Epidemiology and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in water buffaloes from the Hazara division of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. **PLoS One**, v. 17, n. 5, p. e0268152, 2022.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. (ed). Intrinsic and Extrinsic Parameters of Foods That Affect Microbial Growth. In: JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. (ed). **Modern Food Microbiology**. Springer Science. 7 edition. New York: United States of America, 2005. P 39-60

JI, X.; SHEN, Q.; LIU, F.; MA, J.; XU, G.; WANG, Y.; WU, M. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. **Journal of Hazardous Materials**. v. 235–236, p. 178-185, 2012.

JOHANSEN, H. K.; JENSEN, T. G.; DESSAU, R. B.; LUNDGREN, B.; FRIMODT-MOLLER, N. Antagonism between penicillin and erythromycin against *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo. **J Antimicrob Chemother**, 46(6):973-80, 2000.

JONES, G.; BAILEY, T.; ROBERSON, J. *Staphylococcus Aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. **Virginia Cooperative Extension**, 404-229, 2010.

JOO, H.; OTTO, M. Mechanisms of resistance to antimicrobial peptides in staphylococci. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848, n. 11 Pt B, p. 3055-61, 2015.

JORAY, M. B.; PALACIOS, S. M.; CARPINELLA, M. C. Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity. **Phytomedicine**, v. 20, n. 3-4, pp. 258–261, 2013.

JOSSE, J.; LAURENT, F.; DIOT, A. Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. **Front. Microbiol.**, v. 8, p. 2433, 2017.

KADLEC, K.; FEBLER, A. T.; HAUSCHILD, T.; SCHWARZ, S. Novel and uncommon antimicrobial resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 8, p. 745–755, 2012.

KAYILI, E.; SANLIBABA, P. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional cheeses in Turkey. **Internacional Journal of Food Properties**, v. 23, n. 1, p. 1441-1451, 2020.

KEYKHASALAR, R.; TABRIZI, M. H.; ARDALAN, P. Antioxidant Property and Bactericidal Activity of *Linum usitatissimum* Seed Essential Oil Nanoemulsion (LSEO-NE) on *Staphylococcus aureus*. **Int J Infect.**,v.7, n. 2, p. e101639, 2020.

KHALAF, D.D.; RAGAB, T.I.M; MANSOUR, A.S.; ELSHAMY, A.I.; EL-GENDY, A.E.G. Chemically Characterized Essential Oils of *Citrus reticulata* and *Thymus vulgaris* L. and Their Nanoemulsions Inhibited the Pathogenic Microbes Causing Mastitis in Cattle. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 25, n. 5, p. 953-966, 2022

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A.; COLLINS, J. J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, p. 797–810, 2007.

KOLÁŘ, M.; URBÁNEK, K.; LÁTAL, T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 5, p. 357-363, 2001.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. **Pathogens**, 10(2), 165, 2021.

KUHNEN, S.; DE MELLO, D. F. M.; HONORATO, L. A.; PICCININ, I. N.; MARTINS, J.; BERNARDES, P. A.; PINHEIRO MACHADO FILHO, L. C. (2021). Identification and antimicrobial susceptibility of milk pathogen isolated from dairy production systems. **Prev Vet Med**. 194:105451, 2021.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1486-1513, 2005.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1471-1485, 2005.

LEBER, A. Y. (ed.). *Time kill* assay. In: LEBER, A. Y. (ed.) **Clinical Microbiology Procedures Handbook**, 4th Edition. ASM Press, Washington, D.C., 2016, p.5.14.2.1-5.14.2.12, 2016.

LEBER, A.Y. Synergism testing: broth microdilution *checkerboard* and broth macrodilution methods. In: LEBER, A.Y (ed.). **Clinical Microbiology Procedures Handbook**, 4th Edition. ASM Press, Washington, D.C. , 2016, p. 5.16.1-5.16.23

- LEWIS, K.; AUSUBEL, F. Prospects for plant-derived antibacterials. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 12, p. 1504–1507, 2006.
- LEWIS, K. Programmed Death in Bacteria. *ASM Journals **Microbiology and Molecular Biology Reviews***. 64(3):503-14, 2000.
- LI, C. M.; YU, J. P; Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Mechanism of Action of Essential Oil from the Leaves of *Macleaya Cordata* (Willd.) R. Br. **Journal of Food Safety**, 35(2015): 227–236; 2015.
- LOSS, G.; SIMÕES, P. M.; VALOUR, F.; CORTÊS, M. F.; GONZAGA, L.; BERGOT, M.; TROUILLET-ASSANT, S.; JOSSE, J.; DIOT, A.; RICCI, E.; VASCONCELOS, A. T.; LAURENT F. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint Infection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 9, p. 363, 2019.
- LORENZO, D.; ATTI-SERAFINI, L.; SANTOS, A. C.; FRIZZO, C. D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. *Achyrocline satureioides* Essential Oils from Southern Brazil and Uruguay. **Planta Med**, v. 66, n. 5, p. 476–477, 2000.
- LOWY, F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J Clin Invest.**, v. 111, n. 9, p. 1265-73, 2003.
- LUCENA-AGUILAR, G.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. M.; BARBERÁN-ACEITUNO, C.; CARRILLO-ÁVILA, J. A.; LÓPEZ-GUERRERO, J. A.; AGUILAR-QUESADA, R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. **Biopreserv Biobank**,14(4):264-70, 2016.
- MACHADO, V. S.; CAMPONOGARA, C.; OLIVEIRA, S. M.; BALDISSERA, M. D.; SAGRILLO, M. R.; GUNDEL, S. S.; SILVA, A. P. T. D.; OURIQUE, A. F.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; SANTOS, R. C. V.; SILVA, A. S. D. Topical hydrogel containing *Achyrocline satureioides* oily extract (free and nanocapsule) has anti-inflammatory effects and thereby minimizes irritant contact dermatitis. **An Acad Bras Cienc**, v. 92, n. 4, p. e20191066, 2020.
- MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GERACE, E.; BIONDO, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. **Pathogens**, 10(10):1310, 2021.
- MARSTON, H.; DIXON, D.; KNISELY, J.; PALMORE, T.; FAUCI, A. Antimicrobial Resistance. **JAMA**, v. 316, n. 11, p. 1193–1204, 2016.
- MARTÍNEZ-BUSI, M.; ARREDONDO, F.; GONZÁLEZ, D.; ECHEVERRY, C.; VEJA-TEIJIDO, M.; CARVALHO, D.; RODRÍGUEZ-HARALAMBIDES, A.; RIVERA, F.; DAJAS, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J.A. Purification, structural elucidation, antioxidant capacity and neuroprotective potential of the main polyphenolic compounds contained in *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (Compositae). **Bioorg Med Chem**, v. 27, n. 12, p. 2579-2591, 2019.
- MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B.; KOWALEWSKI, C.; KROLAK-ULINSKA, A.; MARUSZA, W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022.

- MOLONEY, M. G. Natural Products as a Source for Novel Antibiotics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 37, n. 8 p. 689–701, 2016.
- MORESCO, K. S.; SILVEIRA, A. K.; ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; CORREA, A. P.; OLIVERIA, R. R.; BORGES, A. G.; GRUN, L.; BARBÉ-TUANA, F.; ZMOZINSKI, A.; BRANDELLI, A.; VALE, M. G. R.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Effects of *Achyrocline satureioides* inflorescence extracts against pathogenic intestinal bacteria: Chemical characterization, in vitro tests, and in vivo evaluation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 4874865, 2017.
- MORIKAWA, K.; TAKEMURA, A.; INOSE, Y.; TSAI, M.; THI, L.; OHTA, T.; MSADEK, T. Expression of a Cryptic Secondary Sigma Factor Gene Unveils Natural Competence for DNA Transformation in *Staphylococcus aureus*. **Plos Pathogens**, v. 8, n.11, p. e1003003, 2012.
- MULLER, P.; MILTON, M. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. **Nat Rev Drug Discov**, 11:751–761, 2012.
- MYLES, I. A.; DATTA, S. K. *Staphylococcus aureus*: an introduction. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 181–184, 2012.
- OLIVEIRA, N.; GONÇALVES, B.; LEE, S.; OLIVEIRA, C.; CORASSIN, C. Use of Antibiotics in Animal Production and Its Impact. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 40-47, 2020.
- ORHAN, G.; BAYRAM, A.; ZER, Y.; BALCI, I. Synergy Tests by E Test and *Checkerboard* Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(1):140–143, 2005.
- OTTO, M. *Staphylococcus aureus* toxins. **Current Opinion in Microbiology**, v. 17, p. 32-37, 2014.
- OTTO, M. P.; MARTIN, E.; BADIOU, C.; LEBRUN, S.; BES, M.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; LINA, G.; DUMITRESCU, O. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**, 68(7):1524-32, 2013.
- OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007.
- PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Front. Microbiol**, v. 3, p. 127, 2012.
- PAUL, T. R.; VENTER, A.; BLASZCZAK, L. C.; PARR, T. R.; LABISCHINSKI, H.; BEVERIDGE, T. J. Localization of penicillin-binding proteins to the splitting system of *Staphylococcus aureus* septa by using a mercury-penicillin V derivative. **Journal of Bacteriology**, 177(13): 3631-40, 1995.

PELGRIFT, A.; FRIEDMAN, J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13-14, p. 1803-1815, 2013.

PÉREZ-PEINADO, C.; DIAS, S. A.; DOMINGUES, M. M.; BENFIELD, A. H.; FREIRE, J. M.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; GASPAR, D.; CASTANHO, M. A. R. B.; CRAIK, D. J.; HENRIQUES, S. T.; VEIGA, A. S.; ANDREU, D. Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalicidin (Ctn) and its fragment Ctn(15-34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom. **J Biol Chem**, 293(5):1536-1549, 2018.

PERGO, E. M.; BRITTA, E. A.; GALLETI, P. A. Metodologia de microscopia eletrônica de transmissão aplicada ao estudo de raízes de plântulas. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 22, n. 1, p. 175-186, 2019.

PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae: development of granules from spray dried powder. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796–803, 2010.

PINHEIRO MACHADO, G.; VELEIRINHO, M.; FERREIRA, R.; ZUGLIANELLO, C.; LEMOS-SENNA, E.; KUHNEN, S. Protection of bovine mammary epithelial cells by a nanoemulsion of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC and its capacity of permeation through mammary epithelium. **Journal of Dairy Research**, v. 89, n. 1, p. 80-85, 2022.

PINHEIRO MACHADO, G. T. B. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sustentáveis com nanoemulsão de macela (*Achyrocline satureioides*) visando à terapêutica da mastite bovina**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, 2021, 181p.

PINHEIRO MACHADO, G.; VELEIRINHO, M.; HONORATO, L.; KUHNEN, S. Formulation and evaluation of anti-MRSA nanoemulsion loaded with *Achyrocline satureioides*: a new sustainable strategy for the bovine mastitis. **Nano Ex.**, v.1, n. 3, p. 030004, 2020.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I.; VICENTINI, V. E. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. **Rev Fitos.**, v. 14, n. 4, p. 513-527, 2020.

PROCTOR, R.; VON EIFF, C.; KAHL, B.; BECKER, K.; MCNAMARA, P.; HERRMANN, M.; PETERS, G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, p. 295–305, 2006.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. Wolf/Mosby, London, 1994, p. 648.

RADOSTITS, O.; GAY, C.; HINCHCLIFF, K.; CONSTABLE, P. Diseases of the mammary gland. In: RADOSTITS, O.; GAY, C.; HINCHCLIFF, K.; CONSTABLE, P. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10 ed. Elsevier Saunders, 2007. p. 673-762.

RAINARD, P.; GILBERT, F. B.; GERMON, P.; FOUCRAS, G. Invited review: A critical appraisal of mastitis vaccines for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 10, p. 10427-10448, 2021

RAMOND, E.; JAMET, A.; DING, X.; EUPHRASIE, D.; BOUVIER, C.; LALLEMANT, L.; HE, X.; ARBIBE, L.; COUREUIL, M.; CHARBIT, A. Reactive Oxygen Species-Dependent Innate Immune Mechanisms Control Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Virulence in the *Drosophila* Larval Model. **mBio**. v. 12, n. 3, p. e0027621, 2021.

RAJ, L. S.; HING, H. L.; BAHARUDIN, O.; HAMIDAH, Z. T.; SUHANA, R. A.; ASIHA, C. P. N.; VIMALA, B.; PARAMSARVARAN, S.; SUMARNI, G.; HANJEET, K. Mesosomes are a definite event in antibiotic-treated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **Trop Biomed.**, 24(1):105-109, 2007.

RASHIDFARROKHI, A.; RICHINA, V.; TAFESSE, F. G. Visualizing the Early Stages of Phagocytosis. **J Vis Exp**, v. 120, p. 54646, 2017.

RASIGADE, J. P.; MOULAY, A.; LHOSTE, Y.; TRISTAN, A.; BES, M.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; LINA, G.; LAURENT, F.; DUMITRESCU, O. Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiol**, 11: 263, 2011.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 2, p. 237–259, 2012.

ROOIJAKKERS, S. H.; RUYKEN, M.; ROOS, A.; DAHA, M. R.; PRESANIS, J. S.; SIM, R. B.; VAN WAMEL, W. J.; VAN KESSEL, K. P.; VAN STRIJP J. A. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. **Nature Immunology**, v. 6, n. 9, p. 920–927, 2005.

ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Front. Physiol**, v. 9, p. 113, 2018.

ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. **Biomed Res Int**, v. 2017, p. 9042851, 2017.

RUFFA, M.; FERRARO, G.; WAGNER, M.; CALCAGNO, M.; CAMPOS, R.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 335–339, 2002.

SADYKOV, R.; BAYLES, K. W. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. **Current Opinion in Microbiology**, 15(2):211-215, 2012.

SALAT, O.; SÉRIEYS, F.; POUTREL, B.; DUREL, L.; GOBY, L. Systemic Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Cows with Penethamate Hydriodide. **Journal of Dairy Science**. 91(2):632-640, 2008.

- SARMA, J. V.; WARD, P. The complement system. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227–235, 2011.
- SANKAR, P. New Therapeutic Strategies to Control and. **Vet Med Open J**, v. 1, n. 2, p. e7-e8, 2016.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 2475067, 2016.
- SANTANA, H. F.; BARBOSA, A. A. T.; FERREIRA, S. O.; MONTOVANI, H. C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 485–491, 2012.
- SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, 42(4), 321– 324, 2007.
- SCOTT, N. Nanoscience in Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**, v. 31, suppl. 1, p. 139–144, 2007.
- SENDI, P.; PROCTOR, R. *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 54-58, 2009.
- SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, 486 p.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKE, E. L.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., Compositae. **J Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281-93, 1988.
- SINHA, B.; FRAUNHOLZ, M. *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2-3, p. 170-175, 2010.
- SMITH, T. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: the United States experience. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 2, p. e1004564, 2015.
- SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock Production Science**, v. 98, n. 1-2, p. 89-99, 2005.
- SOUZA, P. O.; BIANCHI, S. E.; FIGUEIRÓ, F.; HEIMFARTH, L.; MORESCO, K. S.; GONÇALVES, R. M.; HOPPE, J. B.; KLEIN, C. P.; SALBEGO, C. G.; GELAIN, D. P.; BASSANI, V. L.; ZANOTTO FILHO, A.; MOREIRA, J. C. F. Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. **Toxicol in vitro**, v. 51, p. 23–33, 2018.

- SPEROTTO, V. R.; MURARI, A. L.; SILVA, D. A. R.; POSSENTI, G. G. R.; WIEST, J. M.; AVANCINI, C. A. M. Atividade do decocto de *Achyrocline satureioides* D.C. (Lam.) - Asteraceae (“macela”) sobre bactérias padrões e isoladas em mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 3, p. 1052, 2012.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. (ed.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Sexta edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: RJ, 2017, p. 1420.
- SPOOR, L. E.; MCADAM, P.R.; WEINERT, L. A.; RAMBAUT, A., HASMAN, H., AARESTROP, F. M.; KEARNS, A. M.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; FITZGERALD, J. R. Livestock Origin for a Human Pandemic Clone of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **mBio**, v. 4, n. 4, p. e00356-13, 2013.
- STOSCHECK, C.M. Quantitation of Protein. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 50-68, 1990.
- STRAHL, H.; ERRINGTON, J. Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. **Annual Review of Microbiology**. Vol. 71:519-538, 2017.
- TAM, K.; TORRES, V. J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. **Microbio Spectrum**, v. 7, n. 2, p. 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018, 2019.
- THOMPSON, K. M.; ABRAHAM, N.; JEFFERSON, K. K. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein contributes to biofilm formation in the presence of serum. **FEMS Microbiol Lett**, v. 304, n. 2, p. 143-7, 2010.
- TISEO, K.; HUBER, L.; GILBERT, M.; ROBINSON, T. P.; VAN BOECKEL, T. P. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 12, p. 918, 2020.
- TONELLO, N.; PIMENTEL BETANCURT, D.; HUALLPA, C. L.; MARIOLI, J. M.; MORESSI, M. B.; OLIVA, M. L. M.; D'ERAMO, F. Fractionation of hexane extracts from *Achyrocline satureioides* and their biological activities against *Paenibacillus* larvae. **Braz J Microbiol**, v. 53, n. 3, p. 1645–1655, 2022.
- TOUHAMI, A.; JERICHO, M. H.; BEVERIDGE, T. J. Atomic Force Microscopy of Cell Growth and Division in *Staphylococcus aureus*. **ASM Journals, Journal of Bacteriology**, 186(11): 3286–3295, 2004.
- TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, suppl 2, p. S24-S32, 2010.
- VAN KESSEL, K. P.; BESTEBROER, J.; VAN STRIJP, J. A. Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Front. Immunol**, v. 5, p. 467, 2014.
- VARELA-ORTIZ, D. F.; BARBOZA-CORONA, J.; GONZÁLEZ-MARRERO, J.; LEÓN-GALVÁN, M.; VALENCIA-POSADAS, M.; LECHUGA-ARANA, A. A.; SÁNCHEZ-FELIPE, C. G.; LEDEZMA-GARCÍA, F.; GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, A. J. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. **Vet Res Commun**, v. 42, n. 3, p. 243–250, 2018.

VELAZQUEZ-MEZA, M. E.; GALARDE-LÓPEZ, M.; CARRILLO-QUIRÓZ, B.; ALPUCHE-ARANDA, C. Antimicrobial resistance: One Health approach. **Vet World**, v. 15, n. 3, p. 743-749, 2022.

VESTBY, L.; GRØNSETH, T.; SIMM, R.; NESSE, L. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. **Antibiotics (Basel)**, v. 9, n. 2, p. 59, 2020.

VOSS, A.; LOEFFEN, F.; BAKKER, J.; KLAASSEN, C.; WULF, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 12, p. 1965-6, 2005.

WAGNER, E.; FRANK, M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 43-56, 2010.

WALLIS, J.; KRÖMKER, V.; PADUCH, J. Biofilm formation and adhesion to bovine udder epithelium of potentially probiotic lactic acid bacteria. **AIMS Microbiol.**, v. 4, n. 2, p. 209-224, 2018.

WATKINS, R.; HOLUBAR, M.; DAVID, M. Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Newer Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, p. e01216-19, 2019.

WEI, C.; CUI, P.; LIU, X. Antibacterial Activity and Mechanism of Madecassic Acid against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, 28(4): 1895, 2023.

WESTMAN, J.; GRINSTEIN, S. Determinants of Phagosomal pH During Host-Pathogen Interactions. **Front. Cell Dev. Biol.**, 8:624958, 2021.

WOEHL, J. L.; STAPELS, D. A.; GARCIA, B. L.; RAMYAR, K. X.; KEIGHTLEY, A.; RUYKEN, M.; SYRIGA, M.; SFYROERA, G.; WEBER, A. B.; ZOLKIEWSKI, M.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D.; ROOIJAKKERS, S. H. M.; GEISBRECHT, B. V. The Extracellular Adherence Protein from *Staphylococcus aureus* Inhibits the Classical and Lectin Pathways of Complement by Blocking Formation of the C3 Proconvertase. **J Immunol**, v. 193, n. 12, p. 6161–6171, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva, Switzerland: WHO, 2015. 28 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prioritization Of Pathogens To Guide Discovery, Research And Development Of New Antibiotics For Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis**. Geneva, Switzerland: WHO, 2017. 88 p.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n.10, p. 1451-1470, 2005.

XIE, Y.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, 22(1):132-49, 2015.

- XUE, L.; CHEN, Y. Y.; YAN, Z.; LU, W.; WAN, D.; ZHU, H. Staphyloxanthin: a potential target for antivirulence. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2151–2160, 2019.
- YANG, S.-K.; YUSOFF, K.; MAI, C.-W.; LIM, W.-M.; YAP, W.-S.; LIM, S.-H.E.; LAI, K.-S. Additivity vs Synergism: Investigation of the Additive Interaction of Cinnamon Bark Oil and Meropenem in Combinatory Therapy. **Molecules**, 22(11):1733, 2017.
- YOUSSEF, F. S.; EL-BANNA, H. A.; ELZORBA, H. Y.; GALAL, A. M. Application of some nanoparticles in the field of veterinary medicine. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 7, n. 1, p. 78-93, 2019.
- YUAN, G.; GUAN, Y.; YI, H.; LAI, S.; SUN, Y.; CAO, S. Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. **Sci Rep**. 11(10471), 2021.
- YUAN, Z.; OUYANG, P.; GU, K.; REHMAN, T.; ZHANG, T.; YIN, Z.; FU, H.; LIN, J.; HE, C.; SHU, G.; LIANG, X.; YUAN, Z.; SONG, X.; LI, L.; ZOU, Y.; YIN, L. The antibacterial mechanism of oridonin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Pharm Biol**. 57(1):710-716, 2019.
- ZHANG, W.; WANG, J.; CHEN, Y.; ZHENG, H.; XIE, B.; SUN, Z. Flavonoid compounds and antibacterial mechanisms of different parts of white guava (*Psidium guajava* L. cv. Pearl). **Natural Product Research**. 34(11):1621–1625, 2020.
- ZHANG, Y. M.; ROCK, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. **Nat Rev Microbiol**, 6(3):222–233, 2008.
- ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; JIANG, P.; QUEK, S. W. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food control**. v. 59, p. 282-289, 2016.
- ZUNIGA, E.; MELVILLE, P. A.; SAIDENBERG, A. B.; LAES, M. A.; GONSALES, F. F.; SALABERRY, S. R. GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; DOS SANTOS, F. G.; LINCOPAN, N. E.; BENITES, N. R. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus spp.* isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. **Microbial Pathogenesis**, v. 89, pp. 1-6, 2015.