



Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina¹

Talita Thomaz Nader^{2*}, Juliana S. Coppede³, Silvia Helena Taleb-Contini³,
Luiz Augusto Amaral² e Ana Maria S. Pereira³

ABSTRACT.- Nader T.T., Coppede J.S., Taleb-Contini S.H., Amaral L.A. & Pereira A.M.S. 2018. [Antibiofilm activity of *Croton urucurana* compounds against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in dairy cattle.] Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(9):1713-1719. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: talitanader@hotmail.com

Mastitis in dairy cattle is the disease that impacts dairy production the most; *Staphylococcus aureus* is the main causative agent of this condition. The genus *Staphylococcus* has the ability to produce biofilms, an important mechanism of antibiotic resistance. Bearing in mind that plants have therapeutic action, this study investigated the *in vitro* antibiofilm activity of the plant extract and compounds isolated from the species *Croton urucurana*, native to the Brazilian Cerrado, against *Staphylococcus aureus* isolated from the milk of cows with mastitis, as well as the antibiotic gentamycin and vancomycin. The antibiofilm activity was evaluated by means of violet crystal and the counting of Colony Forming Units. The images were obtained by scanning electron microscopy. The *C. urucurana* crude extract and fraction displayed better antibiofilm effect than gentamycin; their antibiofilm action was similar to the action of vancomycin. Compared with all the assessed treatments, the isolated compound α -Costol was significantly more active it reduced six logarithmic cycles of the bacterial population composing the biofilm. The phytocomplexes and the α -Costol substance isolated from *Croton urucurana* are promising in the fight against one of the main etiological agents of bovine mastitis.

INDEX TERMS: Antibiofilm, *Croton urucurana*, *Staphylococcus aureus*, isolated, mastitis, dairy cattle, biofilm, Euphorbiaceae, α -Costol, cattle, bacterioses.

RESUMO.- A mastite bovina é a enfermidade que causa maior impacto na produção leiteira, sendo o microrganismo *Staphylococcus aureus* o mais prevalente. Este gênero possui a capacidade de produzir biofilmes que é um importante mecanismo de resistência aos antibióticos. Considerando a capacidade terapêutica das plantas, a espécie *Croton*

urucurana, nativa do Cerrado, foi alvo do presente estudo, que teve como objetivo avaliar a atividade antibiofilme *in vitro* do extrato vegetal e substâncias isoladas desta espécie, frente *Staphylococcus aureus*, isolados de leite de vacas com mastite, bem como dos antibióticos gentamicina e vancomicina. A atividade antibiofilme foi avaliada por meio do cristal violeta e da contagem de unidades formadoras de colônia. As imagens foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura. O extrato bruto e frações de *C. urucurana* apresentaram atividade antibiofilme superior à gentamicina e semelhante à vancomicina, enquanto a substância isolada α -Costol foi significativamente mais ativa quando comparada aos demais tratamentos avaliados, reduzindo cerca de 6 ciclos logarítmicos da população bacteriana em biofilme. Conclui-se que os fitocomplexos

¹ Recebido em 31 de julho de 2017.

Aceito para publicação em 29 de agosto de 2017.

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Via de acesso Prof. Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. E-mail: lamaral@fcav.unesp.br; *Autor para correspondência: talitanader@hotmail.com

³ Departamento de Biotecnologia de Plantas Mediciniais, Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp), Av. Costabile Romano 2201, Ribeirão Preto, SP 14096-385, Brazil. E-mails: jujucoppede@gmail.com; scontini@unaerp.br; apereira@unaerp.br

e a substância α -Costol isolados de *Croton urucurana* são promissores no combate a um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Antibiofilme, *Croton urucurana*, *Staphylococcus aureus*, isolado, mastite, bovinos, biofilme, Euphorbiaceae, α -Costol, bacterioses.

INTRODUÇÃO

A mastite, caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária, é a enfermidade mais prevalente em rebanhos bovinos destinados a produção leiteira, impactando negativamente na economia desse setor (Langoni et al. 2011). Um rebanho com 15% de prevalência da mastite bovina apresenta 60% de perda da receita bruta (Lopes et al. 2012).

Embora a mastite possa ser ocasionada por inúmeros patógenos, bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são reconhecidas como os agentes etiológicos mais isolados dos casos de infecções intramamárias em ruminantes (Vlieghe et al. 2012). Dentre os diversos fatores de virulência que o gênero *Staphylococcus* apresenta, a capacidade de adesão no epitélio da glândula mamária é considerada um ponto crítico na patogenia da mastite (Hermans et al. 2010). A adesão do *Staphylococcus aureus* está associada à formação de biofilmes em tecidos infectados, como um mecanismo de auto-proteção (Bannerman 2003). Os biofilmes são constituídos de bactérias aderidas a uma superfície, envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos (Sauer et al. 2007). Nos biofilmes os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos, como os antibióticos e produtos utilizados nos procedimentos de higienização (Marques et al. 2007). Os biofilmes de *S. aureus* podem ser formados na glândula mamária das fêmeas com mastite, nas tubulações e equipamentos envolvidos no processo de obtenção e processamento do leite, havendo uma correlação positiva entre a falha nos procedimentos de higiene e a formação destes filmes bacterianos (Arcuri 2000). A produção de biofilme na glândula mamária favorece a cronicidade da infecção, promovendo a seleção de microrganismos resistentes aos antibióticos convencionalmente utilizados no tratamento da mastite (Melchior et al. 2006).

Estratégias de pesquisa com produtos naturais antimicrobianos podem acelerar e baratear a produção de novas substâncias e gerar alternativas ao combate a microrganismos multirresistentes aos agentes terapêuticos disponíveis (Guimaraes et al. 2010). Considerando ainda que o custo de desenvolvimento de uma nova molécula sintética pode ultrapassar US\$ 1,3 bilhão, moléculas extraídas de espécies vegetais com atividade antimicrobiana têm sido apontadas como uma das alternativas mais viáveis para o descobrimento de novas drogas (Dimasi & Grabowski 2007). Extratos vegetais e substâncias isoladas apresentam resultados significativos na inibição ou erradicação do biofilme de *Staphylococcus* (Freire et al. 2009, Gomes 2010, Oliveira 2011, Cobrado et al. 2012, Saising et al. 2011). O Brasil é um país megabiodiverso e dentre a imensa riqueza da flora, o gênero *Croton* se destaca por apresentar espécies como *C. nepetaefolius* que produz oditerpeno casbano, com acentuada atividade frente *S. aureus* em biofilme

(Carneiro et al. 2011) e *C. urucurana*, popularmente conhecida como Sangue de dragão, cujo extrato e compostos isolados possuem ação antibacteriana *in vitro* frente *S. aureus* livre (Peres et al. 1997, Simionatto et al. 2007, Silva Junior et al. 2009, Zuchinalli 2009).

Considerando que trabalhos anteriores demonstraram a atividade de *C. urucurana* em células livres de *S. aureus*, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial *in vitro* do extrato e substância isolada dessa espécie e dos antibióticos gentamicina e vancomicina, frente *S. aureus* em biofilme, isolados de leite de vacas com mastite.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal. Casca e entrecasca do caule de *Croton urucurana* foram coletadas no mês de agosto, no município de Jardinópolis, estado de São Paulo, Brasil (latitude 21°11'55,5", longitude 47°44'08,8" e altitude 566m). As partes vegetais coletadas foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 50°C, e em seguida, moída. (Número do processo de autorização para coleta de material vegetal concedido pelo IBAMA: 02001.00579/2011-41).

Extração e isolamento dos compostos. O material vegetal em pó foi submetido ao processo de maceração estática, utilizando o solvente hexano, em temperatura ambiente, com homogeneização periódica por 10 dias. Após obtenção do extrato hexânico, realizou-se cromatografia em coluna de sílica gel (Silicagel Acrós®, 0.060-0.200mm, 60 A; Geel, Belgium), seguida de análise cromatográfica de camada delgada (tlc; Aldrich, gel de sílica GF254 60 20cm×20cm×0,25mm). Este processo resultou em 5 frações diferenciadas por perfis cromatográficos, as quais foram avaliadas quanto à atividade antibiofilme, por meio da técnica que determina a concentração mínima da substância capaz de inibir a formação do biofilme bacteriano, descrita no item "atividade antibiofilme". A fração mais ativa foi re-cromatografada resultando em uma substância isolada, analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), segundo metodologia descrita por Nader (2014). A identificação da substância foi efetuada através da comparação do seu espectro de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (NIST 62 lib.) e índice de retenção de Kovats (Adams 1995).

Preparação de extratos e compostos de *Croton urucurana* para ensaio. O extrato e as frações foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80, ambos na concentração de 2,5% (p/v). A substância pura foi solubilizada em meio de cultura líquido estéril Brain Heart Infusion (BHI-Himedia®). Foi realizado o controle dos veículos utilizados na solubilização dos extratos.

Microrganismos. Foram utilizadas quatro estirpes de *Staphylococcus Aureus* isoladas de leite de vacas com mastite e caracterizadas genotípica e fenotipicamente por Melo et al. (2012) como produtoras de biofilme, e uma padrão ATCC 25923.

Tratamentos. As dosagens dos tratamentos foram determinadas pelo método da concentração inibitória mínima (MIC), que consiste na menor concentração de uma substância capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano (CLSI 2012). A partir de uma concentração inicial de cada tratamento realizou-se uma diluição em série e em placa estéril de poliestireno com 96 poços em fundo "U" foram adicionados 100µL em cada poço juntamente com 100µL de inóculo bacteriano padronizado, contendo *S. aureus* em meio líquido Brain Heart Infusion (BHI - Himedia®) enriquecido com glicose (2%). As placas foram incubadas em condições adequadas

para a formação do biofilme bacteriano, conforme descrito no item seguinte, e após 24 horas foi realizada a leitura. Determinou-se a MIC do extrato bruto, fração, subfração e substâncias isoladas nas respectivas concentrações de 5mg.ml⁻¹, 2,5mg.ml⁻¹, 500µg.ml⁻¹ e 250µg.ml⁻¹. A concentração do antibiótico gentamicina (Sigma aldrich®) foi determinada em 30mg.ml⁻¹, enquanto a vancomicina (Sigma aldrich®) variou entre 4 a 32µg.ml⁻¹.

Produção de biofilme *in vitro*. As estirpes de *S. aureus* foram cultivadas individualmente em ágar Brain Heart Infusion (BHI-Himedia®) a 37°C, e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica. Utilizando meio de cultura líquido BHI (Himedia®) enriquecido com glicose (2%), o inóculo foi padronizado em espectrofotômetro (comprimento de onda 546nm), correspondendo a 10⁵UFC.ml⁻¹, e distribuídos em placas de microtitulação (96 poços), que permaneceram incubadas a 37°C sob agitação (120rpm), por 24 horas. Os poços foram lavados duas vezes com solução salina 0,9% para remoção das células não aderidas (Gomes 2010).

Atividade antibiofilme. A determinação da concentração inibitória mínima das substâncias em biofilme foi realizada por meio da avaliação da inibição na formação do biofilme bacteriano (MBIC) e da avaliação na erradicação do biofilme já formado (MBEC). Para a determinação do MBIC, os tratamentos foram adicionados ao inóculo padronizado e incubados em placas de 96 poços a 37°C, sob agitação (120rpm), por 24 horas, e sucessivamente realizada a leitura. Para determinar a MBEC, inicialmente o biofilme de *S. aureus* foi formado e após 24 horas os poços foram lavados para remoção das células em suspensão e permanência apenas das células aderidas. Logo após, os tratamentos foram acrescentados à placa juntamente com meio de cultura e depois de 24 horas de incubação, a 37°C, sob agitação (120rpm), realizou-se a leitura (Gomes 2010). O método utilizado para a leitura da MBIC foi o Cristal Violeta (CV), enquanto para leitura da MBEC foi utilizado o CV e a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

Cristal violeta (CV). A técnica do CV consistiu na adição de metanol para fixação das células aderidas, seguida da adição do cristal violeta (Dinamica®) e uso de ácido acético a 33% para leitura de densidade óptica do biofilme (570nm) (Gomes 2010).

Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Após a formação do biofilme, as placas de microtitulação foram lavadas com solução salina estéril e o conteúdo aderido às paredes do poço foi raspado. A placa foi submetida a um banho de ultrassom, padronizado, neste experimento, em 8 minutos, na frequência de 40Hz (Unique® Ultrasonic Cleaner). Após homogeneização realizou-se a diluição em série em até doze vezes e fez-se o plaqueamento em placas de Petri de 90mm contendo ágar BHI, na forma de gotejamento (3 gotas/10µL cada). A incubação ocorreu por 24 horas a 37°C (Gomes 2010). Os valores obtidos foram transformados em escala logarítmica.

Microscopia eletrônica por varredura. Para a obtenção de imagens de microscopia eletrônica por varredura, a adesão de *S. aureus* ocorreu em cupons de aço inoxidável, utilizando a metodologia descrita para a determinação da concentração inibitória mínima de inibição do biofilme (Alves 2004, Gomes 2010).

Análise estatística. A análise estatística do experimento foi realizada pelo programa SISVAR, desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras, versão Sisvar 5.1 Build 72 (Ferreira 2011). O teste estatístico aplicado foi Scott Knott, com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração mínima de inibição em biofilme (MBIC).

Para todas as estirpes avaliadas, a MBIC do sulfato de vancomicina variou de acordo com a condição da multiplicação celular e com o método de avaliação da atividade antibacteriana. A técnica do cristal violeta demonstrou que 4µg.ml⁻¹ de vancomicina foi o suficiente para inibir a formação do biofilme de todas as estirpes avaliadas e que foram necessários 8µg.ml⁻¹ para eliminar 100% da biomassa do biofilme maduro (24 horas). Entretanto, utilizando a técnica da contagem de unidades formadoras de colônias, a vancomicina na concentração de 32µg.ml⁻¹, que é a máxima permitida em humanos (Liu et al. 2011), não foi capaz de eliminar totalmente as bactérias aderidas.

Este aumento da concentração da vancomicina para inibir células aderidas justifica-se pela resistência que estes microrganismos apresentam ao se multiplicarem no biofilme (Davey & O'Toole 2000). Em estudo realizado por Reiter et al. (2012), o antibiótico vancomicina erradicou biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus* em concentrações 64 a 32.000 vezes maior do que a dosagem utilizada para eliminação destas células planctônicas. Coraça-Huber et al. (2012) avaliaram a atividade da vancomicina frente *S. aureus* e determinaram MIC de 1µg.ml⁻¹ para as células planctônicas, enquanto as células aderidas apresentaram MBEC acima de 256µg.ml⁻¹.

O extrato vegetal de *Croton urucurana* (5mg.ml⁻¹) foi capaz de inibir 88,94% da formação da matriz bacteriana de *S. aureus*, enquanto a gentamicina (30mg.ml⁻¹) inibiu 85,45% e a vancomicina (4µg.ml⁻¹) 100% (Quadro 1). Portanto, estatisticamente, não foi observada diferença significativa entre a atividade inibitória do extrato vegetal e os antibióticos avaliados ($p>0,05$). A técnica do cristal violeta, utilizada neste estudo, é um método colorimétrico eficiente para mensurar a quantidade de biomassa formada, pois o cristal violeta é um corante básico que se liga a moléculas de superfície e polissacarídeos de carga negativa presentes na matriz bacteriana extracelular (Li et al. 2003).

Os veículos utilizados na solubilização dos extratos e substância isolada não apresentaram qualquer atividade inibitória sobre as estirpes de *S. aureus* avaliadas.

Concentração mínima de erradicação em biofilme (MBEC).

O extrato de *C. urucurana* (5mg.ml⁻¹), por meio do cristal violeta, erradicou 50,03% da matriz de *S. aureus* (24 horas de formação), enquanto a gentamicina (30mg.ml⁻¹) eliminou 13,94% e a vancomicina (4µg.ml⁻¹) 100% da biomassa bacteriana. De acordo com os resultados obtidos, o extrato vegetal apresentou atividade inferior ao antibiótico vancomicina, porém significativamente superior à gentamicina ($p<0,05$) (Quadro 1).

O sulfato de gentamicina foi utilizado neste estudo como tratamento comparativo por ser o antibiótico mais amplamente utilizado para o tratamento de mastite bovina (Fontana et al. 2010, Branco et al. 2012). Os resultados demonstraram que o extrato vegetal de *C. urucurana* teve melhor inibição de *S. aureus* em biofilme quando comparado ao antibiótico gentamicina, e em concentração seis vezes menor.

Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). O extrato de *C. urucurana* (5mg.ml⁻¹) e a vancomicina (32µg.ml⁻¹)

Quadro 1. Atividade antibiofilme de extrato e substâncias isoladas de *Croton urucurana* e dos antibióticos gentamicina e vancomicina frente *Staphylococcus aureus*

Concentração mínima em biofilme	Tratamentos					
	<i>Croton urucurana</i>			Antibióticos		
	Extrato hexânico 5g.mL ⁻¹	Fração acetato 250mg.mL ⁻¹	Subfração 500µg.mL ⁻¹	α-Costol 125µg.mL ⁻¹	Gentamicina 30mg.mL ⁻¹	Vancomicina 4-32µg.mL ⁻¹
Inibição (%)	88.94 a	-	-	-	85.45 a	100.00 a ^a
Erradicação cristal violeta (%)	50.03 b	-	-	-	13.94 c	100.00 a ^b
Erradicação contagem UFC (Log UFC.mL ⁻¹)	4.16 b	4.46 b	4.90 b	6.14 a	3.14 c	4.60 b ^c

Médias seguidas por letras distintas nas linhas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p=0,05). - Não avaliado; ^a 4µg.mL⁻¹, ^b 8µg.mL⁻¹, ^c 32µg.mL⁻¹.

apresentaram médias estatisticamente semelhantes na redução da população de *S. aureus* em biofilme, na ordem de 4 ciclos logarítmicos, enquanto a gentamicina (30mg.mL⁻¹) apresentou atividade estatisticamente inferior, em torno de 3 ciclos logarítmicos (Quadro 1). Estes resultados corroboram com os obtidos por Rose & Poppens (2009), uma vez que os autores utilizaram vancomicina na concentração de 15µg.mL⁻¹, ou seja, em torno da metade da concentração avaliada no presente estudo e conseguiram diminuir 1,8 ciclos logarítmicos na quantidade de unidades formadoras de colônia de *S. aureus* em biofilme, proporcionalmente semelhante aos resultados aqui demonstrados.

Dentre as frações obtidas do extrato de *C. urucurana*, a denominada acetato de etila (2,5mg.mL⁻¹) e sua subfração (500µg.mL⁻¹) foram as que mais significativamente atuaram sobre *S. aureus*, reduzindo a população bacteriana aderida em 4 ciclos logarítmicos. A substância α-Costol (Fig.1) isolada do extrato foi capaz de diminuir a quantidade de unidades formadoras de colônia de *S. aureus* em 6 ciclos logarítmicos, na concentração de 125µg.mL⁻¹, apresentando resultado estatisticamente superior aos antibióticos e aos extratos e subfrações avaliadas (Quadro 1). Ainda que haja trabalhos mostrando a atividade de extratos vegetais sobre microrganismos aderidos, esta é a primeira vez que está sendo demonstrada a efetividade de extratos e substância isolada de *C. urucurana*, frente a células bacterianas em biofilme.

A substância α-Costol é um álcool sesquiterpeno oxigenado, identificada anteriormente em quantidades significativas no óleo essencial de *Pelargonium graveolens* (Rana et al. 2002), *Callitris* sp. (Doimo 2001) e *Magydaris tomentosa* (Khaoukha et al. 2014). De acordo com Oh et al. (2011) esta substância apresenta atividade inibitória *in vitro* de Na⁺/K⁺ATPase sobre diversos microrganismos, bem como ação inibitória frente *Staphylococcus epidermidis*.

Substâncias puras ou extratos vegetais com potencial atividade antibiofilme podem atuar através do bloqueio da adesão celular bacteriana a uma superfície ou por meio do rompimento da comunicação celular bacteriana (Pinto 2011, Rutherford & Bassler 2012, Trentin et al. 2013). Embora o mecanismo de ação do extrato hexânico e substâncias de *C. urucurana* sejam desconhecidos, o perfil lipofílico (apolar) destes compostos também pode contribuir para sua atividade antibiofilme. De acordo com Pinto (2011), dentre as diversas características físico-químicas de

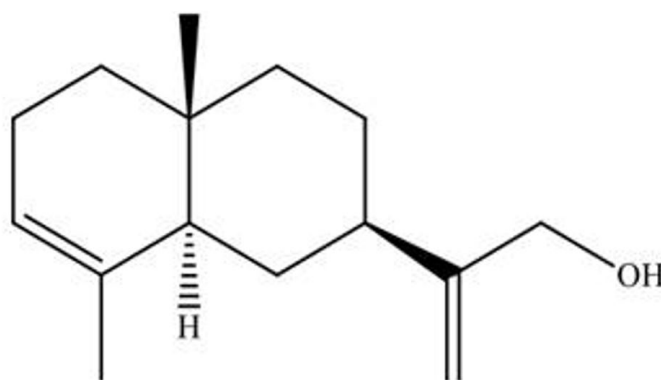


Fig.1. Estrutura química do composto isolado alfa-Costol.

um agente antimicrobiano, a polaridade é a que mais diretamente interfere na penetração da substância na matriz do biofilme.

Conhecendo os mecanismos de resistência inerentes às células bacterianas aderidas, é evidente que os padrões determinados aceitáveis para as células livres são inadequados para as células em biofilme. Em estudos recentes, as concentrações inibitórias mínimas de erradicação de biofilme das substâncias puras variaram entre 0,25µg.mL⁻¹ a 512µg.mL⁻¹ (Saising et al. 2011, Cobrado et al. 2012), enquanto os extratos brutos de plantas agem em concentrações que atingem até 200mg.mL⁻¹ (Freire et al. 2009).

Para células livres, Ríos & Recio (2005) consideram válidos em termos de prospecção terapêutica, a atividade antimicrobiana de extratos vegetais em concentrações inferiores a 100µg.mL⁻¹ e, em se tratando de substâncias puras a concentração máxima aceitável é de 10µg.mL⁻¹. Em contrapartida, Eloff (2004) define como 100mg.mL⁻¹ a maior concentração tolerável para atividade antimicrobiana de extratos vegetais.

Microscopia eletrônica. Nas imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica observou-se em todos os tratamentos avaliados uma inibição significativa na quantidade aderida de unidades formadoras de colônia de *S. aureus*, com destaque para a subfração, oriunda do extrato bruto de *C. urucurana*, na qual não foram encontradas colônias aderidas (Fig.2).

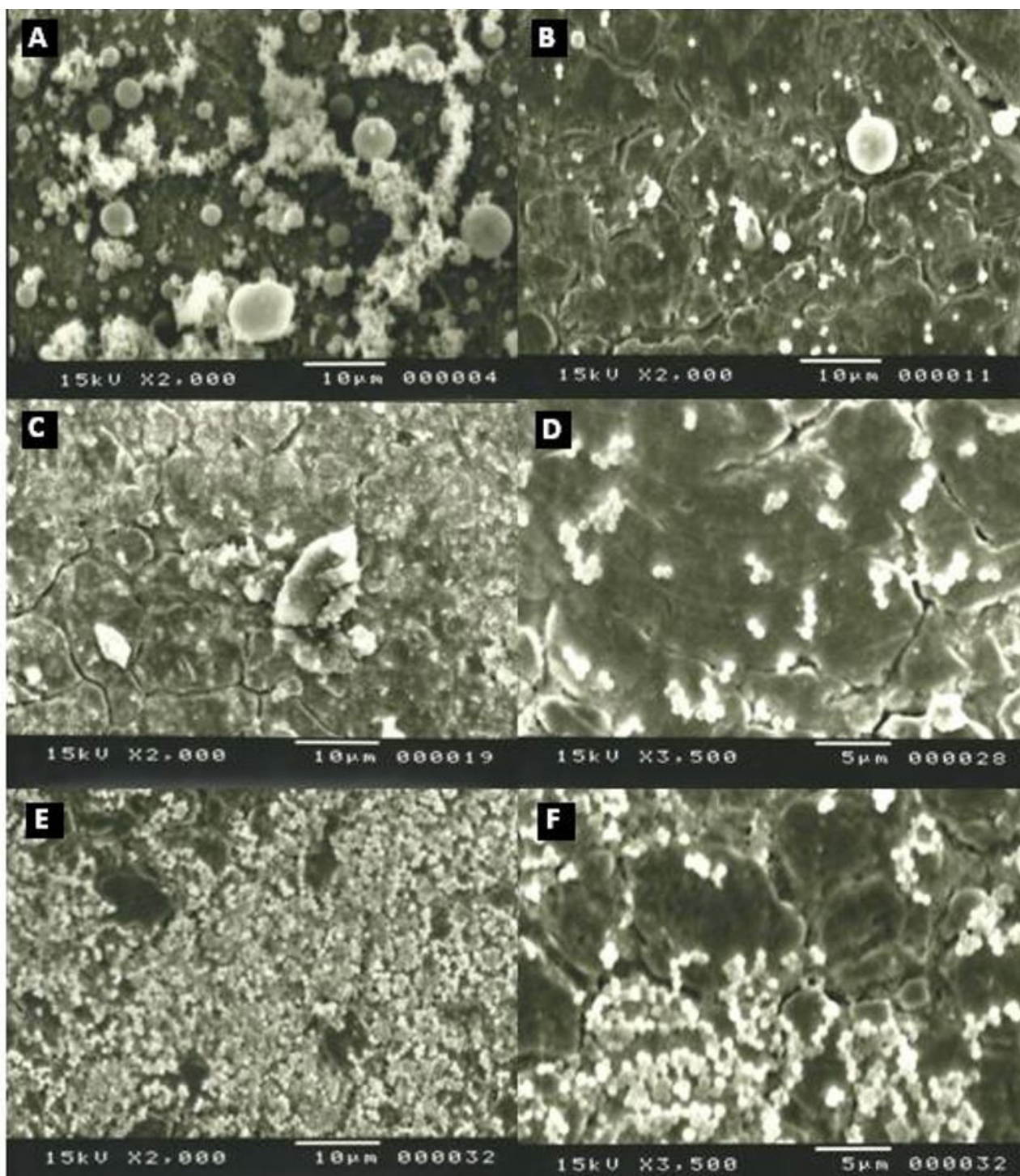


Fig.2. Microscopia eletrônica de varredura da inibição da formação do biofilme de *Staphylococcus aureus*. (A) Extrato de *Croton urucurana*, (B) fração acetato de *C. urucurana*, (C) subfração de *C. urucurana*, (D) vancomicina, (E,F) inóculo não tratado (controle).

CONCLUSÕES

O extrato hexânico de *Croton urucurana* foi superior ao antibiótico gentamicina na erradicação da biomassa e da população de *Staphylococcus aureus* aderida.

As frações e subfrações do extrato de *C. urucurana* erradicaram a população de *S. aureus* em biofilme de forma equivalente ao extrato vegetal e ao antibiótico vancomicina.

A substância α -Costol, isolada a partir do extrato bruto de *Croton urucurana*, teve atividade destacada na erradicação da população aderida de *S. aureus*, com melhor desempenho que os antibióticos gentamicina e vancomicina.

A atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Croton urucurana* e de α -Costol frente *S. aureus* em biofilme demonstra o potencial de atividade da espécie e do composto isolado sobre o mais prevalente microrganismo causador da mastite bovina.

Agradecimentos.- Os autores agradecem ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista por ceder os isolados bacterianos de *Staphylococcus aureus*, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-2011/50340-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq - 146997/2010-7) por financiar a execução deste experimento.

REFERÊNCIAS

- Adams R.P. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured, Carol Stream, IL. 456p.
- Alves E. 2004. Introduction to Scanning Electron Microscopy. FAEP, Lavras, MG. 43p.
- Arcuri E.F. 2000. Bacterial biofilms in the food industry. *Revta Leite Deriv.* (9):40-45.
- Bannerman T.L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci grow aerobically, p.384-404. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Tenover F.C. & Tenover F.C. (Eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Branco L.O., Dias R.F. & Ribeiro A.M.C.L. 2012. Basis of drugs for mastitis sold more in the region of Uberlândia. *Vet. Notícias* (18):26.
- Carneiro V.A., Santos H.S., Arruda F.V.S., Bandeira P.N., Albuquerque M.R.J.R., Pereira M.A., Henriques M., Cavada B.S. & Teixeira E.H. 2011. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 16(1):190-201. <<http://dx.doi.org/10.3390/molecules16010190>> <PMid:21193844>
- CLSI 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 9th ed. CLSI Document M07-A9 Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 88p.
- Cobrado L., Azevedo M.M., Dias A.S., Ramos J.P., Pina Vaz C. & Rodrigues A.G. 2012. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J. Antimicrob. Chemoter.* (67):1159-1162.
- Coração-Huber D.C., Fille M., Hausdorfer J., Pfaller K. & Nogler M. 2012. *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antibiotic susceptibility tests on polystyrene and metal surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 112(6):1235-1243. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05288.x>> <PMid:22435667>
- Davey M.E. & O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4):847-867. <<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>> <PMid:11104821>
- Dimasi J.A. & Grabowski H.G. 2007. The cost of biopharmaceutical R&D: is biotech different? *Managerial and Decision Economics* 28(4/5):469-479. <<http://dx.doi.org/10.1002/mde.1360>>
- Doimo L. 2001. Azulenes, costols and Γ -lactones from cypress-pines (*Callitris columellaris*, *C. glaucohylla* and *C. intratropica*) distilled oils and methanol extracts. *J. Essential Oil Res.* 13(1):25-29. <<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2001.9699594>>
- Eloff J.N. 2004. Quantification the bioactivity of plants extracts during screening and bioassay guided fractionation. *Phytomedicine* 11(4):370-371. <<http://dx.doi.org/10.1078/0944711041495218>> <PMid:15185853>
- Ferreira D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotecnol.* 35(6):1039-1042. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>>
- Fontana V.L.D.S., Giannini M.J.S.M., Leite C.Q.F., Miranda E.T., Almeida A.M.F., Fontana C.A.P., Souza C.M. & Stella A.E. 2010. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene β -Lactamase in *Staphylococcus aureus*. *Vet. Zootec.* 17(4):552-559.
- Freire F., Pereira C.A., Costa A.C.P.B., Junqueira J.C. & Jorge A.O.C. 2009. *In vitro* evaluation of antibacterial glycoextracts of *Rosmarinus officinalis* and *Syzygium cumini* on coagulase-negative and positive staphylococci biofilm. 21^o Congresso de Iniciação Científica Unesp, São José do Rio Preto, SP. 10p. (Resumo)
- Gomes I.A.G. 2010. New therapeutic strategies against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, Portugal.
- Guimaraes D.O., Momesso L.S. & Pupo M.T. 2010. Antibiotics: therapeutic importance and prospects for the discovery and development of new agents. *Quím. Nova* 33(3):667-679.
- Hermans K., Devriese L.A. & Haesebrouck F. 2010. *Staphylococcus*, p.75-89. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. & Thoen C.O. (Eds), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 4th ed. Wiley-Blackwell, Oxford. <<http://dx.doi.org/10.1002/9780470958209.ch5>>
- Khaoukha G., Jemia M.B., Amira S., Laouer H., Bruno M., Scandolera E. & Senatore F. 2014. Characterisation and antimicrobial activity of the volatile components of the flowers of *Magyaris tomentosa* (Desf.) DC. collected in Sicily and Algeria. *Nat. Prod. Res.* 28(15):1152-1158. <<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.919289>> <PMid:24871127>
- Langoni H., Penachio D.S., Citadella J.C.C., Laurino F., Faccioli-Martins P.Y., Lucheis S.B., Menozzi B.D. & Silva A.V. 2011. Quality and microbiological aspects of bovine milk. *Pesq. Vet. Bras.* 31(12):1059-1065. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011001200004>>
- Li X., Yan Z. & Xu J. 2003. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 149(Pt 2):353-362. <<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.25932-0>> <PMid:12624197>
- Liu C., Bayer A., Cosgrove S.E., Daum R.S., Fridkin S.K., Gorwitz R.J., Kaplan S.L., Karchmer A.W., Levine D.P., Murray B.E., Rybak M.J., Talan D.A. & Chambers H.F. 2011. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin. Infect. Dis.* 52(3):18-55. <<http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciq146>>
- Lopes M.A., Demeu F.A., Rocha C.M.B.M., Costa G.M., Franco Neto A. & Santos G. 2012. Influence of the economic impact of mastitis in dairy cattle. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 79(4):477-483.
- Marques C.S., Rezende J.G.O.S., Alves L.A.F., Silva B.C., Alves E., Abreu L.R. & Piccoli R.H. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Braz. J. Microbiol.* 38(3):548-553. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000300029>>
- Melchior M.B., Vaarkamp H. & Fink Gremmels J. 2006. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet. J.* 171(3):398-407. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.01.006>> <PMid:16624706>
- Melo P.C., Ferreira L.M., Nader Filho A., Zafalon L.F. & Vicente H.I.G. 2012. Phenotypic and molecular analysis of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated of bovine mastitis case. *Biosci. J.* 28(1):94-99.
- Nader T.T. 2014. *In vitro* antibacterial activity of extracts and substances isolated from *Croton* species against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. Tese de Doutorado, Unesp, Jaboticabal. 92p.
- Oh I., Yang W.Y., Park J., Lee S., Mar W., Oh K.B. & Shin J. 2011. *In Vitro* Na⁺/K⁺-ATPase inhibitory activity and antimicrobial activity of sesquiterpenes isolated from *Thujopsis dolabrata*. *Arch. Pharmacol. Res.* 34(12):2141-2147. <<http://dx.doi.org/10.1007/s12272-011-1218-5>> <PMid:22210041>
- Oliveira M.M.M. 2011. Essential oils in the control of bacterial biofilms: *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* enteropathogenic. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 138p.
- Peres M.T.L.P., Monache F.D., Cruz A.B., Pizzolatti M.G. & Yunes R.A. 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *J. Ethnophar.* 56(3):223-226. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00039-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00039-1)> <PMid:9201612>
- Pinto C.C.F. 2011. Evaluation of the penetration of antimicrobial agents on biofilm of *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*: physical-

- chemical considerations. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 87p.
- Rana V.S., Juyal J.P. & Blazquez M.A. 2002. Chemical constituents of essential oil of *Pelargonium graveolens* leaves. *Int. J. Aromather.* 12(4):216-218. <[http://dx.doi.org/10.1016/S0962-4562\(03\)00003-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0962-4562(03)00003-1)>
- Reiter K.C., Sambrano G.E., Villa B., Paim T.G., Oliveira C.F. & D'Azevedo P.A. 2012. Rifampicin fails to eradicate mature biofilm formed by methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 45(4):471-474. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000400011>> <PMid:22930045>
- Ríos J.L. & Recio M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 100(1/2):80-84. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>> <PMid:15964727>
- Rose W.E. & Poppens P.T. 2009. Impact of biofilm on the *in vitro* activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63(3):485-488. <<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn513>> <PMid:19109338>
- Rutherford S.T. & Bassler B.L. 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *CSH Perspect.* 2(11):1-26. <PMid:23125205>
- Saising J., Ongsakul M. & Voravuthikunchai S.P. 2011. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: a potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 60(Pt.12):1793-1800. <<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.033092-0>> <PMid:21816945>
- Sauer K., Rickard A.H. & Davies D.G. 2007. Biofilms and biocomplexity. *Microbe* 2(7):347-353.
- Silva Junior I.E., Cechinel Filho V., Zacchino S.A., Lima J.C.S. & Martins D.T.O. 2009. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Revta Bras. Farmacogn.* 19(1b):242-248. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000200011>>
- Simionatto E., Bonani V.F.L., Morel A.F., Poppi N.R., Raposo Júnior J.L., Stuker C.Z., Peruzzo G.M., Peres M.T.L.P. & Hess S.C. 2007. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. *J. Braz. Chem. Soc.* 18(5):879-885. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000500002>>
- Trentin D.S., Giordani R.B. & Macedo A.J. 2013. Pathogenic bacterial biofilms: general aspects, clinical importance and combat strategies. *Revta Liberato* 14(22):113-238.
- Vliegher S., Fox L.K., Piepers S., McDougall S. & Barkema H.W. 2012. Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.* 95(3):1025-1040. <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-4074>> <PMid:22365187>
- Zuchinalli A. 2009. Study of chemical, structural and biological properties of plant species *Croton urucurana*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 91p.