

## RESUMO 78. SUSCEPTIBILIDADE DOS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA A PRÓPOLIS DE ABELHAS *Tetragonisca angustula* E *Melipona quadrifasciata*

Ana Clara Serpa Carvalho<sup>1</sup>; Alice Gonçalves dos Reis<sup>1</sup>; Maysa Serpa Gonçalves<sup>1</sup>; Marcilene Daniel Damasceno<sup>1</sup>; Dirceia Aparecida da Costa Custódio<sup>1</sup>; Gláucia Frasnelli Mian<sup>1</sup>; Alessandro de Sá Guimarães<sup>2</sup>; Elaine Maria Seles Dorneles<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras - Lavras - MG – Brasil

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Gado de Leite - Juiz de Fora - MG – Brasil

### INTRODUÇÃO

A mastite bovina, definida como inflamação da glândula mamária causada principalmente por bactérias, é um dos maiores desafios enfrentados pela pecuária leiteira. Esta doença pode levar a prejuízos como comprometimento da saúde do úbere dos animais, o gasto com tratamentos, o descarte de leite e a diminuição da quantidade e qualidade do leite. Entre os microrganismos mais isolados em quadros de mastite, podemos mencionar: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*. A utilização de compostos antimicrobianos é um dos pilares do controle e prevenção da mastite, através da utilização do dipping, imersão dos tetos em solução antisséptica antes e após a ordenha, ou de infusões intramamárias utilizadas cotidianamente em tratamentos e terapias de secagem. Em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos, estudos alertam sobre o desenvolvimento de resistência bacteriana em patógenos causadores de mastite. Logo, torna-se necessário buscar novos compostos que possam ser utilizados na prevenção e no tratamento da doença. Nessa perspectiva, a própolis, um material resinoso produzido por abelhas a partir da flora local, que possui atividade antimicrobiana associada a ação sinérgica de diferentes princípios químicos, pode ser uma alternativa. O presente estudo objetivou avaliar a susceptibilidade *in vitro* de cepas de referência e cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de mastite bovina ao extrato alcoólico de própolis produzido por abelhas das espécies *Tetragonisca angustula* e *Melipona quadrifasciata* da região de Lavras, Minas Gerais.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados própolis *in natura* de abelhas nacionais: das espécies *Tetragonisca angustula* e *Melipona quadrifasciata* da região de Lavras. Cada amostra foi extraída em concentração de 10% (1:10) em etanol 70% (v/v) por meio de agitação contínua e sonicação. Em seguida, os extratos alcoólicos de própolis foram filtrados, rotavaporizados, secos, liofilizados e, por fim, ressuspensos em etanol 70% na concentração de 10 mg/mL.

Os microrganismos submetidos ao teste de concentração inibitória mínima foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2921, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, *Streptococcus uberis* ATCC 700407; além disso, amostras multirresistentes de *E. coli* (n=6) e *S. aureus* (n=4) isoladas de casos de mastite bovina que fazem parte da coleção de Microrganismos dos Laboratórios Integrados de Sanidade Animal e Saúde Coletiva (LISASC), da Universidade Federal de Lavras.

As cepas de cada bactéria foram cultivadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 37 °C a 24 h, e para as amostras de *Streptococcus spp.*, ágar BHI enriquecido com sangue ovino. A concentração inibitória mínima (CIM) para cada extrato alcoólico de própolis foi obtida através da técnica de microdiluição, adaptada a partir do protocolo de recomendação para avaliação da resistência a antibióticos em bactérias de crescimento aeróbico do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) manuais M100 e M07 (CLSI, 2018). As colônias bacterianas foram suspensas em 0,85% de solução salina utilizando a escala de 0.5 MCFarlland.

O ensaio foi realizado em duplicatas e cada própolis foi diluída em caldo estéril de Mueller Hinton para obtenção de concentração máxima de 5,0 mg/mL e mínima de 0,001 mg/mL (1:2 v/v). Por fim, as placas foram incubadas a 37 °C, por 16 a 20 horas, sendo realizada a leitura e interpretação

no final deste tempo. Realizou-se interpretação do resultado de forma visual seguida de semeadura em ágar Muller Hinton dos poços em que não foram notados crescimento bacteriano para avaliar se a ação dos antissépticos tratava-se de bactericida ou bacteriostático. Ensaio utilizando álcool 70% foram realizados para avaliação do efeito antimicrobiano do álcool contido no extrato. Gentamicina foi utilizada para controle de qualidade dos inóculos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As CIMs de cada extrato alcoólico de própolis para cada isolado testado estão demonstradas nas Figura 1. Analisando o ensaio foi possível observar que na concentração de 5 mg/mL, todas as cepas foram inibidas pelo extrato alcoólico de própolis, exceto uma cepa multirresistente *E. coli* [93,75% (15/16)]. Além disso, os extratos testados mostraram variações na susceptibilidade entre diferentes tipos de microrganismos. No geral, microrganismos Gram-negativos, como *E. coli*, apresentaram maior resistência e necessitaram de concentrações mais elevadas do extrato para serem inibidos, em comparação com microrganismos Gram-positivos, como *S. aureus*. As cepas de referência de *S. uberis* e *S. agalactiae* foram inibidas em menores concentrações de ambos extratos. Quando comparados os extratos, o obtido da espécie *Melipona quadrifasciata* apresentou melhor desempenho, sendo capaz de inibir alguns microrganismos em menor concentração, possivelmente devido ao diferente perfil de princípios ativos presentes na própolis produzida pelas diferentes espécies de abelha. Estudos serão realizados para determinar a composição bioquímica dos compostos.

**Imagem 1.** CIM dos extratos alcoólicos de própolis testados para cada isolado.



limitante para utilização do extrato em infusões intramamárias, uma vez que nessa região existem estruturas delicadas. Além disso, o tempo de exposição necessário dos microrganismos ao princípio ativo e seu tempo de duração necessitam ser melhores estudados, no presente estudo as cepas foram expostas ao extrato durante 24 horas, já no cotidiano o uso de dippings são realizados em segundos e as infusões intramamárias para terapias em vacas secas necessitam desempenhar longo efeito de duração.

## **CONCLUSÃO**

Os extratos alcoólicos de própolis obtidos das abelhas nacionais *Tetragonisca angustula* e *Melipona quadrifasciata* da região de Lavras tiveram efeito antimicrobiano contra a maioria dos microrganismos testados. Apontando potencial como alternativa de antimicrobiano de base natural, todavia, estudos in vivo são necessários para compreender o potencial antimicrobiano e concentração indicada para o uso do composto.