

RESUMO 90. SUSCEPTIBILIDADE DOS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA A PRÓPOLIS DE *Apis mellifera*

Alice Gonçalves dos Reis¹; Ana Clara de Serpa Carvalho²; Maysa Serpa Goncalves²; Marcilene Daniel Damasceno²; Gláucia Frasnelli Mian²; Alessandro de Sá Guimarães³; Elaine Maria Seles Dorneles²

¹Universidade Federal de Lavras - UFLA - Sete Lagoas - MG – Brasil

²Universidade Federal de Lavras - UFLA - LAVRAS - MG – Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - Juiz de Fora - MG – Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite bovina, caracterizada pela inflamação da glândula mamária, é a principal doença que atinge os rebanhos leiteiros no Brasil e no mundo. É causada principalmente por bactérias, podendo ser de origem ambiental ou contagiosa, e causa grandes prejuízos econômicos devido ao gasto com tratamento e descarte do leite, além de diminuir a produção e a qualidade do leite dos animais infectados e comprometer a saúde da glândula mamária para lactações futuras. Entre os microrganismos importantes na etiologia da mastite, podemos destacar: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*. Normalmente o tratamento da mastite bovina requer utilização de antibióticos, o que leva a um grande consumo dessas drogas nas fazendas leiteiras. Além disso, como prevenção da mastite são adotadas técnicas como o dipping, que consiste na imersão dos tetos dos animais em soluções antissépticas, antes e após a ordenha, e terapias de vaca seca, com inoculação intramamária de antimicrobianos após a secagem do animal, a fim de tratar infecções estabelecidas e prevenir novas infecções. Contudo, a resistência bacteriana a antimicrobianos e antissépticos vem sendo relatada na literatura, devido a exposição frequente a estes princípios ativos e pressão seletiva para emergência de cepas mutantes. Neste sentido, faz-se necessário a busca por antimicrobianos alternativos para prevenção e tratamento da doença. Uma possibilidade é a própolis, um composto natural produzido por abelhas cuja atividade antimicrobiana é conferida por um conjunto de princípios ativos que atuam em sinergia, dificultando o desenvolvimento de resistência bacteriana. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade *in vitro* de cepas de referência e cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de mastite bovina a três extratos alcoólicos de própolis de abelhas da espécie *Apis Mellifera*, produzidos nas cidades de Lavras, Barbacena e São Vicente de Minas, em Minas Gerais, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de própolis verde, produzidas por abelhas *Apis mellifera*, foram adquiridas de produtores comerciais nas cidades de Lavras, Barbacena e São Vicente de Minas, em Minas Gerais. As própolis foram extraídas em concentração de 10% (1:10) em etanol 70% (v/v) por meio de agitação contínua e sonicação. Em seguida, os extratos foram filtrados, rotavaporizados, secos e liofilizados. Por fim, ressuspendeu-se o conteúdo liofilizado em etanol 70% na concentração de 10 mg/mL.

Os microrganismos utilizados para 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, testou-se dez cepas multirresistentes (resistentes a 4 ou mais classes antimicrobianas) de *E. coli* (n=6) e *S. aureus* (n=4) isoladas de casos de mastite bovina, pertencentes a coleção de Microrganismos dos Laboratórios Integrados de Sanidade Animal e Saúde Coletiva (LISASC), da Universidade Federal de Lavras.

Para testar seu potencial antimicrobiano foram realizados testes de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), adaptando o protocolo preconizado para testes com antimicrobianos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), manuais M100 e M07 (CLSI, 2018). Todas as espécies bacterianas foram cultivadas em ágar Mueller Hinton, enriquecido com 5% de sangue ovino para as *Streptococcus spp.*, e incubadas a 37 °C por 24 h. O

inóculo bacteriano foi ajustado na concentração 0,5 da escala de McFarland utilizando solução salina (NaCl 0,85%, pH 7.0). Os ensaios foram realizados em duplicata em caldo Mueller Hinton e os extratos de própolis foram diluídos (1:2 v/v) em para obter a concentração inicial testada de 5,0 mg/mL. A interpretação do resultado foi realizada de forma visual seguida de semeadura em ágar do conteúdo dos poços em que não foram observado crescimento bacteriano, a fim de determinar ação bactericida ou bacteriostática. Ensaios 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 na Tabela 1. De forma geral, na concentração de 5 mg/mL, os extratos foram capazes de inibir todas as cepas, com exceção de uma *E. coli* multirresistente isolada de mastite [93,75% (15/16)]. Foram observadas variações em relação ao tipo de microrganismos, com bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) requerendo uma maior concentração do composto para serem inibidas. Observou-se também variação entre os extratos, sendo o extrato 3, de São Vicente de Minas, capaz de inibir as cepas em uma concentração menor do que os demais. Estas diferenças provavelmente se devem a variações nos componentes químicos destes extratos, entre eles os flavonóides, associados a atividade antimicrobiana. Estudos futuros para caracterização bioquímica destes compostos serão realizados e comparados a atividade antimicrobiana *in vitro*.

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

Apis melifera Lavras x Amostras de referência										
PA	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PA	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EF	CID	CID	X	X	X	X	X	X	X	X
EF	CID	CID	X	X	X	X	X	X	X	X
EC	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X	X
EC	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X	X
SA	CID	CID	CID	CID	STA	X	X	X	X	X
SA	CID	CID	CID	CID	STA	X	X	X	X	X

Apis melifera Lavras x Amostras de referência + Amostras multiresistentes E. coli										
167M	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X	X
167M	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X	X
173M	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
173M	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
UB	CID	CID	STA	STA	STA	X	X	X	X	X
UB	CID	CID	STA	STA	STA	X	X	X	X	X
AG	CID	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X
AG	CID	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X

Apis melifera Barbacena x Amostras de referência										
PA	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PA	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EF	CID	CID	X	X	X	X	X	X	X	X
EF	CID	CID	X	X	X	X	X	X	X	X
EC	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EC	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SA	CID	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X
SA	CID	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X

Apis melifera Barbacena x Amostras de referência + Amostras multiresistentes E. coli										
167M	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X
167M	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X
173M	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X
173M	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X
UB	CID	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
UB	CID	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
AG	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X	X
AG	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X	X

Apis melifera São Vicente x Amostras de referência										
PA	STA	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X
PA	STA	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X
EF	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
EF	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
EC	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
EC	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
SA	STA	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X
SA	STA	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X

Apis melifera São Vicente x Amostras de referência + Amostras multiresistentes E. coli										
167M	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
167M	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
173M	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X
173M	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X
UB	STA	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X
UB	STA	STA	STA	STA	STA	X	X	X	X	X
AG	STA	STA	STA	STA	STA	CID	X	X	X	X
AG	STA	STA	STA	STA	STA	CID	X	X	X	X

Alcool x amostras de referência										
PA	CID	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
PA	CID	STA	STA	STA	X	X	X	X	X	X
EF	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EF	STA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EC	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
EC	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
SA	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SA	CID	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Alcool x amostras multiresistentes de E. coli + amostras de referência										
167M	CID	CID	STA	STA	X	X	X	X	X	X
167M	CID	CID	STA	STA	X	X	X	X	X	X
173M	CID	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X
173M	CID	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X
UB	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X	X
UB	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X	X
AG	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X	X
AG	CID	CID	CID	CID	X	X	X	X	X	X

Alcool x amostras multiresistentes de S. aureus										
274	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
274	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
352	CID	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X
352	CID	STA	STA	X	X	X	X	X	X	X
75	CID	CID	CID	STA	STA	X	X	X	X	X
75	CID	CID	CID	STA	STA	X	X	X	X	X
78	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X	X
78	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X	X

Alcool x amostras multiresistentes de E. coli										
65M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
65M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
67M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
67M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
68M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
68M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
164M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X
164M	CID	CID	STA	X	X	X	X	X	X	X

X	Crescimento bacteriano
	Efeito inibitório Etanol
	Efeito inibitório Própolis+álcool
CID	Efeito bactericida
STA	Efeito bacteriostático
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
EF	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
UB	<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407
AG	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813
EC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
IC	Controle do Inóculo
MC	Controle esterilidade do meio

Do ponto de vista prático, os resultados se mostraram promissores para a adoção do extrato alcoólico de própolis para prevenir ou tratar infecções intramamárias, uma vez que cepas multiresistentes isoladas de mastite foram inibidas pelo composto. Contudo, estudos in vivo ainda precisam ser realizados para determinação da concentração ideal para utilização a campo nas diferentes formas (dipping, tratamento de vaca seca ou terapia antimicrobiana), bem como a segurança do composto em contato com os tecidos animais. Neste sentido, a utilização nos tetos, como dipping, parece uma alternativa mais segura que a inoculação intramamária, devido a possível

ação abrasiva do etanol. Além disso, a utilização como tratamento precisa ser melhor investigada, uma vez que outros estudos demonstraram uma possível inibição do efeito bactericida da própolis em contato com o leite. Por fim, é importante mencionar que a ação bactericida foi determinada em ensaio *in vitro* com 24 h de exposição ao princípio ativo, enquanto o tempo de exposição para a técnica de dipping é reduzido, sendo um fator a ser levado em consideração ao determinar concentração em estudos futuros.

CONCLUSÃO

Extratos alcoólicos de própolis das abelhas africanizadas *Apis mellifera* das regiões testadas mostraram atividade bactericida *in vitro* contra cepas bacterianas de referência e contra cepas multirresistente de *E. coli* e *S. aureus*. Sugerindo que existe potencial para utilização da própolis como antimicrobiano em quadros de mastite bovina.