

## INIBIÇÃO DO GÊNERO *Staphylococcus* spp. POR PRÓPOLIS MARROM

RAULENE RODRIGUES LOBO<sup>1</sup>; TONY PICOLI<sup>1</sup>; JÉSSICA SEVILHA BARBOSA<sup>2</sup>; IVE FRANCESCA TROCCOLI HEPPER<sup>2</sup>; GEFERSON FISCHER<sup>3</sup>; GILBERTO D'ÁVILA VARGAS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutorando do PPGV - UFPel – raulenelobot@gmail.com; picolivet@gmail.com

<sup>2</sup>Acadêmica de Medicina Veterinária - UFPel –jessicasevilha@hotmail.com; ivehepper@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Professor do Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel - gdavilavargas@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma resina natural, coletada pelas abelhas através de diversas partes da vegetação. Sua composição varia de acordo com a espécie vegetal, a sazonalidade e espécie de abelha (BANKOVA, 2005). A coloração varia de acordo com sua procedência, podendo ser marrom escuro esverdeada ou marrom avermelhado e odor característico, que pode variar (MARCUCCI, 1996). Já foram identificados mais de 200 componentes em diferentes amostras de própolis (BANKOVA et al., 2000) que lhe conferem propriedades biológicas e farmacológicas já descritas em literatura, como atividade antiviral, antifúngica, antiprotozoária, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, dentre outras (MARCUCCI, 1996; KUMAZAWA et al., 2004). Quanto a sua ação antimicrobiana é conhecido que a presença da própolis inibi o crescimento bacteriano de diversas espécies Gram positivas e Gram negativas (MARCUCCI, 1996).

O gênero *Staphylococcus* spp. se apresentam como cocos Gram positivos, catalase positiva e, a enzima coagulase divide esse gênero em dois grandes grupos, os coagulase positiva e negativa, e a partir destas informações, testes como a capacidade hemolítica, produção de acetoina e fermentação de carboidratos como manitol, maltose e trealose ajudam a caracterizar e diferenciar as principais espécies presentes em rebanhos leiteiros como causadores de mastite bovina: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. epidermidis* (QUINN et al, 2005). É um dos micro-organismos que mais causam prejuízos na produção leiteira, pois é tido como o patógeno de maior relevância na etiologia da mastite bovina. Além disso, representa perigo à saúde pública, pois alimentos contaminados por suas toxinas podem causar gastroenterites alimentares, através do leite produzido por um quarto mamário infectado (ZECCONI & HAHN, 2000).

A resistência desses micro-organismos a antimicrobianos sintéticos vêm sendo descrita há décadas e está vinculado ao uso indiscriminado e inadequado dos fármacos (COSTA, 1996). BRITO (2001) relata que os antibióticos β-lactâmicos fazem parte do grupo cujos estafilococos apresentam maior resistência. Além disso, os consumidores dos produtos de origem animal vêm apresentando uma preocupação crescente com resíduos de antibióticos nos produtos, o que levaria a uma seleção de micro-organismos resistentes e os tratamentos disponíveis já não mais teriam êxito. Por esse motivo há uma demanda cada vez maior por métodos alternativos no tratamento e prevenção de enfermidades e, compostos naturais estão cada vez mais presentes em medicina veterinária. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer o período necessário para que, bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. sejam inativadas em contato com extratos etanólicos de própolis marrom.

## 2. METODOLOGIA

As amostras de própolis marrom foram coletadas de colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera*, trituradas e imersas em álcool etílico absoluto na proporção de uma parte de própolis para 3 partes de álcool para retirada de seus compostos bioativos e, sob agitação, permaneceu durante 48 horas sob temperatura de 37°C. O composto foi filtrado e rotaevaporado para retirada do álcool e, a concentração foi obtida através da diferença das pesagens de 2 gramas do composto antes e depois de sua exposição à temperatura de 100°C durante duas horas. Para emulsificação do composto foi utilizado emulsificante comercial EUMULGIN® HRE-40. A esterilização do composto foi realizada em filtro hidrofílico com porosidade de 22µm. Após, foi realizada diluição com água destilada estéril até a concentração de uso (25 mg/mL).

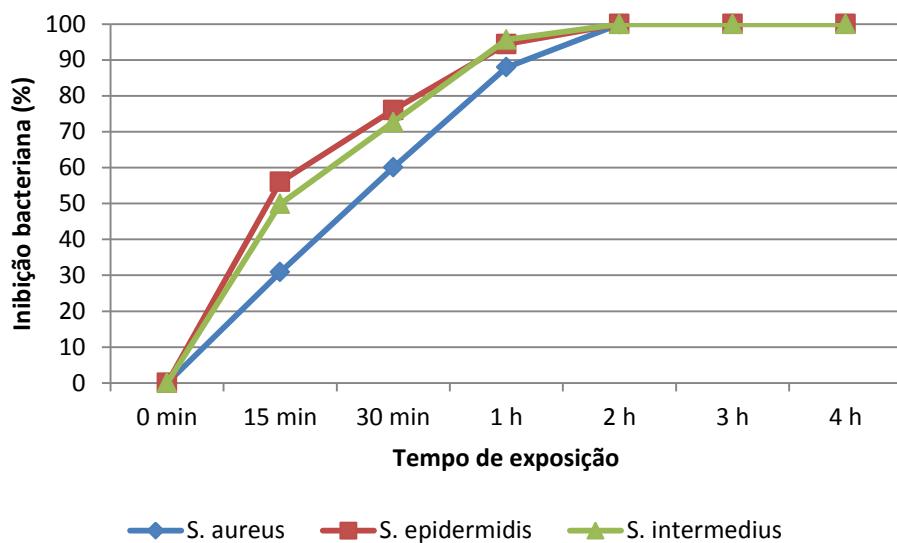
Os estafilococos utilizados foram isolados do leite coletado em tanques resfriadores de propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul, e caracterizados segundo Quinn (2011) e armazenados sob temperatura de -20°C em caldo BHI com glicerol até o momento do uso. Foram descongelados 6 cepas de *S. aureus*, 6 cepas de *S. intermedius* e 6 cepas de *S. epidermidis* e semeadas em Agar sangue ovino 5% e incubados por 24 horas em estufa bacteriológica em condições de aerobiose a 37°C, quando foram suspensas em solução salina estéril a 0,85% até turbidez ajustada sob a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL) e diluída 3 vezes na base 10. Essas suspensões foram colocadas em contato com solução de própolis marrom 25 mg/mL em dois tubos distintos e incubados a 37°C. Esses tubos foram coletadas amostras em 8 momentos, que foram semeadas em triplicata: zero minutos (apenas suspensão bacteriana), 15 minutos, 30 minutos, 01 hora, 02 horas, 03, horas, 04 horas, 05 horas e 06 horas. Foram semeados 100 µL em placas contendo Agar PCA (Plate Count Agar) utilizando a técnica pour-plate. Após 24 horas de incubação, as placas foram submetidas a contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) e os resultados foram analisados com auxílio do software estatístico BioEstat versão 5.3, através de análise de variância e comparação entre médias pelo teste de Tukey.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois primeiros momentos avaliados (15 e 30 minutos de incubação), as contagens de *S. aureus* diferiram estatisticamente ( $p<0,05$ ) das contagens das demais espécies, apresentando-se mais elevadas. Em apenas 15 minutos de incubação com a solução de própolis marrom (25 mg/mL), *S. epidermidis* foi inibido em 56,01%, *S. epidermidis* em 49,87% e *S. aureus* em apenas 30,88%. Aos 30 minutos 76,02% das colônias de *S. epidermidis* haviam sido inibidas e 72,63% das colônias de *S. intermedius*, ao passo que, *S. aureus* teve apenas 60,01% de inibição. A partir de uma hora de incubação não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre as contagens dos micro-organismos estudados. Todos foram inibidos em mais de 88% com uma hora de incubação e, com duas horas de incubação, todas as colônias de *S. intermedius* e *S. epidermidis* haviam sido eliminadas, restando apenas 1,1% das colônias iniciais de *S. aureus*. A Figura 1 ilustra as taxas de inibição das colônias de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. epidermidis* em função do tempo de exposição à solução de própolis marrom.

Nota-se a maior resistência de *S. aureus* quando comparado à outros micro-organismos do mesmo gênero e, esta é a espécie mais importante do gênero *Staphylococcus*, apresentando o maior número de fatores de

patogenicidade e resistência (SILVA et al., 2007). Em nosso estudo, *S. epidermidis* apresentou a maior sensibilidade entre as três espécies avaliadas. Essa espécie não produz coagulase, um importante fator de patogenicidade e virulência (QUINN, 2005).



**Figura 1.** Porcentagem de inibição do crescimento do gênero *Staphylococcus* spp. em função do tempo de exposição à extrato hidro-alcoólico de própolis marrom

Costa et al. (2009) não encontrou diferenças entre o uso de própolis a 1% e o uso de soluções cloradas na desinfecção de hortaliças e, Hoepers et al., (2011), ao estudar os efeitos desinfetantes da própolis em quartos mamários de vacas em lactação, relatou que 100 µL de extrato de própolis a 35% utilizado isoladamente na desinfecção externa dos tetos pode ser recomendado, uma vez que foi capaz de inibir 100% do crescimento microbiano, além de diminuir a ocorrência da mastite subclínica nos rebanhos.

Os resultados obtidos são promissores para a cadeia de produção de leite, já que o gênero *Staphylococcus* spp. encontra-se como um dos principais causadores de mastite bovina e contaminantes do leite após obtenção do mesmo. O potencial da própolis como desinfetante pode ser estudado como método de desinfecção de tetos pré-ordenha ou mesmo desinfecção de equipamentos, utensílios ou tubulações utilizadas no processo de obtenção e armazenamento de leite, assim como em outras áreas em medicina veterinária e, a utilização de concentrações maiores da apresentada nesse estudo tende a diminuir o tempo de inativação bacteriana. Após pesquisas mais aprofundadas, o tratamento de enfermidades com própolis pode ser uma boa alternativa à resistência microbiana aos fármacos sintéticos.

#### 4. CONCLUSÕES

O extrato hidro-alcoólico da própolis marrom, apresentou atividade inibitória total do crescimento bacteriano de *S. intermedius* e *S. epidermidis* com duas horas de contato com a solução de própolis não ocorrendo o mesmo com *S. aureus*, que demonstrou maior resistência quando comparados com outros micro-

organismos. O extrato de própolis apresenta potencial de desinfecção podendo ser utilizado como alternativa em sistemas de produção de leite.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethno pharmacology**, v.100, p.114-117, 2005
- BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L. DE; MARCUCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.
- COSTA, E. O, MANGERONA, A. M., BENITS, N.R. et al. Avaliação de campo de quatro tratamentos intramamária de mastite clínica bovina. **A hora Veterinária**, ano 16, n.93, p.19-21, 1996.
- COSTA, J. A M.; MITTARAQUISI, A. S. P.; FURTADO, M.C.; CARVALHO, L. M.; CARNELOSSI, M. A. G. Efeito da sanitização na qualidade microbiológica do manjericão. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p.3411-3418, 2009
- HOEPERS, C.A.; SILVA, B.T.; MARCUSSO, P.F.; COSENZA, G.R.; PORTO, E.P.; MATSUMOTO, L.S.; PEIXOTO, E.C.T.M. Utilização de Própolis no controle da mastite bovina: desinfecção e selante de tetos. 38 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. In: **Anais....**, Florianópolis, 2011.
- KUMAZAWA, S. et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Oxon, v.84, n.3, p.329-339, 2004.
- MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis, **Quím. Nova**. São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- SILVA, B. E. C. F.; MACIEL, M. A V.; MELO, F. L.; ANTAS, M. D. G. C.; NETO, A. M. B.; RABELO, M. ***Staphylococcus aureus***: aspectos biológicos e patogênicos, Revista Anais. da Faculdade.de Medicina da. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, v.52, n.2,p.168-172, 2007
- ZECCONI, A.; HAHN, G. ***Staphylococcus aureus*** in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15-18, 2000.