

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS CONTRA BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MESTITE EM BOVINOS

GABRIELA THAÍS KLAHR¹; BRUNO BERVIG COLLARES²; JOSÉ VICTOR VIEIRA ISOLA³; DICIANE ZENI GIEHL⁴; LUCIANE RUMPEL SEGABINAZZI⁵

¹Universidade Federal do Pampa– gabriela.klahr3@gmail.com

²Universidade Federal do Pampa– collaresbb@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – jvisola@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – dicigiehl@hotmail.com

⁵Universidade Federal do Pampa– lucianesegabinazzi@unipampa.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância coletada pelas abelhas, especialmente pela *Apis Mellifera*, a partir de resinas de brotos de vegetais. Na colméia, a própolis é utilizada para forrar os alvéolos e câmara onde as rainhas depositam os ovos e também serve para vedar as entradas e orifícios da colméia, além de servir como emulsificante, caso a colméia seja invadida por algum inseto ou animal que as abelhas não consigam retirar (WIELSE, 1995).

Os estudos com relação à ação antimicrobiana do extrato etanólico de própolis (EEP) vêm sendo desenvolvidos há muitos anos, sendo que o principal empecilho é a diversificada composição do extrato, que apresenta variação conforme a região e vegetação disponíveis para a coleta pelas abelhas, assim como a época e a seletividade de cada colméia (MARCUCCI et al., 2001; PARK et al., 2002). A própolis é composta por aproximadamente 50% de resina e bálsamo de vegetais, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, e de acordo com isto, a composição da própolis é o reflexo da flora vegetal da região onde as abelhas coletam as resinas (WIELSE, 1995; RUSSO et al., 2002).

Atividades como a criação orgânica de gado leiteiro apresentam uma grande demanda por produtos com propriedades como as apresentadas pelo própolis. A criação orgânica se trata de uma área em expansão que vem conquistando muitos consumidores, especialmente em países desenvolvidos. Produtos orgânicos contam com 4% das vendas de alimentos nos EUA, enquanto produtos oriundos de fazendas orgânicas compõem 15% das ofertas de produtos (USDA, 2017). No Brasil acredita-se que a ideia de uma fazenda orgânica esteja em expansão, no entanto, há uma escassez de dados mercadológicos que confirmem isso.

A mastite, popularmente conhecida por mamite, consiste de um processo inflamatório da glândula mamária, podendo ser causada por micro-organismos (bactérias, fungos, algas e vírus), traumas físicos e agentes químicos irritantes, causando mudanças físico-químicas na composição do leite e no aumento de células somáticas. (TRONCO, 2003 e LANGONI, 2000).

Além de prejudicar a qualidade do leite, que perde bonificações, a contaminação bacteriana interfere na industrialização, diminuindo o tempo de prateleira do leite fluido e de seus derivados. Além disto, a presença de micro-organismos patogênicos, pode comprometer a segurança alimentar do consumidor (BRITO, et al., 2000; BRITO e BRITO, 2001; LANGONI, 2013).

Visando estes fatores O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de própolis (EEP) em diferentes

concentrações contra 13 diferentes gêneros de agentes bacterianos causadores de mastite em bovinos leiteiros.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no laboratório de Parasitologia e Microbiologia da Universidade Federal do Pampa, Campus Dom Pedrito – RS, Brasil, entre os meses de Março e Junho de 2016.

A própolis utilizada no experimento foi extraída de colméias de abelhas africanizadas, localizados na Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. A própolis bruta foi coletada por raspagem e posteriormente fragmentada e macerada. Para a obtenção do EEP, utilizou-se álcool 96°GL, na proporção de 70%, obtendo-se assim, o extrato de própolis a 30%. Este extrato foi acondicionado em frascos âmbar por 42 dias consecutivos onde se procedeu a agitação diária de 30 segundos, conforme FRANCO E BUENO (1999). Ao término, obteve-se o extrato etanólico de própolis por meio de filtração. A leitura do teor alcoólico do EEP final foi obtida com a ajuda de um alcoômetro, tendo como resultado 67°GL.

Para a realização da atividade antimicrobiana *in vitro* e da concentração inibitória mínima (CIM) do EEP, foram utilizadas cepas bacterianas padronizadas de *Escherichia coli*, derivada do *American Type Culture Collection* (ATCC), *Staphylococcus aureus*, derivada ATCC 25923, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus lugdunensis*. As demais bactérias utilizadas foram isoladas de coletas de campo, provenientes de amostras de leite e de swabs da superfície de tetos de vacas leiteiras. São elas: *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella sp.*, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.* e *Streptococcus spp.*

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de acordo com a metodologia descrita por Duarte et al. (2003), com modificações. Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 20µL de EEP em diferentes concentrações ((30, 25, 20, 15, 10 e 5% (p/v)), 10µL dos inócuos bacterianos e 170µL de BHI Ágar. Como controle positivo foi utilizado apenas o meio de cultura (BHI) com o inócuo e cada ensaio também incluiu a verificação do efeito do solvente do extrato, álcool 67°GL, sobre o crescimento microbiano.

As microplacas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foram realizadas leituras com o revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), a 2%. Foram adicionados 20µL do TTC em cada orifício das microplacas. Após 2 horas, procedeu-se a leitura através da verificação da coloração dos poços, onde os poços que coraram de vermelho-rosa, indicaram crescimento microbiano e os que permaneceram incolores, não. Os testes foram realizados em duplicata. A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada a CIM a menor concentração do EEP capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Os resultados do experimento *in vivo* foram analisados por meio do software SAS, pelo teste de médias de Tukey a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de CIM do EEP com concentrações distintas, em relação às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas abaixo relacionadas, pode ser observado na Tabela 1. A concentração 5% apresentou diferença estatística para

as concentrações 30, 25, 20, 15 e 10% ($p = 0,0391$) e também para o álcool ($p = 0,0016$).

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima do extrato etanólico de própolis em diferentes concentrações

Bactérias		EEP					Álcool	
		30%	25%	20%	15%	10%	5%	67° GL
Gram-positivas	<i>Micrococcus</i> spp.	SC	SC	SC	SC	SC	CC	CC
	<i>S. aureus</i>	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
	<i>S. lugdunensis</i>	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
	<i>Bacillus</i> spp.	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
	<i>Corynebacterium</i> spp.	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
	<i>S. warneri</i>	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
	<i>Streptococcus</i> spp.	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
Gram-negativas	<i>E. coli</i>	SC	SC	SC	SC	SC	R	CC
	<i>Pseudomonas</i> sp.	SC	SC	SC	SC	SC	R	CC
	<i>Enterobacter</i> spp.	SC	SC	SC	SC	SC	R	CC
	<i>Salmonella</i> sp.	SC	SC	SC	SC	SC	R	CC
	<i>Klebsiella</i> sp.	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
	<i>Citrobacter</i> sp.	SC	SC	SC	SC	SC	SC	CC
Fisher Exact test		a	a	a	a	a	b	c

- SC – Sem crescimento bacteriano, CC – Com crescimento bacteriano

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o crescimento de todas as bactérias foi inibido com o EEP nas concentrações de 30, 25, 20, 15 e 10%. A CIM para os gêneros *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* sp. *E. Citrobacter* sp. e as cepas de *E. coli* e *Staphylococcus warneri* foi obtida com EEP a 5%. Os gêneros *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* spp. e *Salmonella* sp. e as estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus lugdunensis* apresentaram como CIM, EEP a 10%.

Conforme pode ser observado, o EEP inibiu o crescimento de 5 das 6 bactérias Gram-positivas testadas (83%) na concentração de 5% do extrato, ao 36 modo que na mesma concentração, nas Gram-negativas, o EEP inibiu o crescimento de 3 das 7 cepas (42%) e o restante das bactérias demonstraram inibição ao extrato na concentração de 10%. A menor CIM, com EEP 5% (p/v), mostrou-se mais eficiente contra as bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas.

A CIM mais alta para as Gram-negativas pode ser explicada devido à complexidade química da parede celular destas bactérias (SFORCIN et al. 2000). A bicamada lipídica da parede celular é obtusa pra antibióticos, sejam estes naturais ou químicos (BUZZATO et AL., 2011). Estas características são consideradas um dos fatores limitantes para a atividade antibacteriana do própolis.

4. CONCLUSÕES

O EEP na concentração de 10% (p/v), no teste in vitro, apresentou atividade antimicrobiana para todas as bacterias testadas no experimento e que estão envolvidas em processos de mastite em gado leiteiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite. In: MADALENA, F. H.; MATOS, L. L.; HOLANDA JUNIOR, E. V. (Ed.). *Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 61-74.
- BUZZATO, V.; FABIANO, M. Z.; FILHO, R. M. Estudo de ação de própolis verde em bactérias gram-positivas e gram-negativas. In: *JORNADA CIENTÍFICA – EMBRAPA*, III, 2011, São Carlos. *Anais...* São Carlos: EMBRAPA, 2011. Versão eletrônica.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. *Infarma*, Brasília, v. 11, p. 11-12, 1999.
- LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, São Paulo, v. 3, p. 57-64, 2000.
- LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica, v. 33, p. 5, 2013.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities**. *Journal of Ethnopharmacology*, Shannon, v. 74, p. 105-112, 2001.
- PARK, Y. K.; ALENKAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. **Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.
- RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. **Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin**. *Fitoterapia*, Milan, v. 73, p. 21-29, 2002.
- SFORCIN, J. L.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Shannon, v. 73, n. 2, p. 243-249, 2000.
- TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. Santa Maria: UFSM, 2003. 168 p.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. Organic market overview. 2017. Disponível em <<https://www.ers.usda.gov/topics/natural-resources-environment/organic-agriculture/organic-market-overview/>>. Acesso em: 18 junho 2017.
- WIELSE, H. **Novo manual de apicultura**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 292 p.