

Utilização de própolis como alternativa no controlo de mastites para garantir a qualidade do leite e proteção da saúde pública

Andrade N. P. C. Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, naracavalcanti@zipmail.com.br; Costa M. M. Universidade Federal do Vale do São Francisco-BR, mmatiuzzi@hotmail.com; Laranjo M. Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora, mlaranjo@uevora.pt and Queiroga M. C. Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, crique@uevora.pt

Introdução

Os antimicrobianos e antissépticos são utilizados para o controlo das mastites. Esta prática conduz a eliminação de resíduos no leite além de induzir a pressão de seleção sobre estirpes resistentes a antimicrobianos. O consumo de leite com resíduos de antimicrobianos e/ou microrganismos resistentes a estes fármacos é prejudicial para saúde pública. Genes de resistência a antimicrobianos têm sido detetados em agentes patogénicos causadores de mastite em ovelhas e cabras (Viridis et al., 2010, Martins et al., 2017), e a presença dessas estirpes resistentes nos produtos leiteiros pode ocasionar a transferência de genes de resistência para os microrganismos da microbiota indígena no intestino dos humanos (Lee 2003). Também já foram referidos genes de resistência a desinfetantes, presentes em *Staphylococci* isolados a partir de leite de bovinos e caprinos (Contreras et al., 2007). É necessário tomar medidas para evitar o desenvolvimento e disseminação de bactérias multirresistentes, portanto é urgente desenvolver métodos alternativos para controlo de doenças nos animais utilizando substâncias com poder antimicrobiano que sejam seguras para a saúde pública. A própolis é uma massa, utilizada para proteger as colmeias das abelhas (*Apis mellifera*), formada por resinas retiradas de vários vegetais, selecionadas de forma natural pelas abelhas. Este produto altamente variável, consoante os vegetais utilizados, apresenta colorações diversas e também qualidades antimicrobianas variáveis. O objetivo deste estudo foi testar a suscetibilidade, de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de amostras de leite de cabras e ovelhas com mastite, a 16 antimicrobianos utilizados em Portugal no controlo desta doença, e analisar “in vitro” a ação antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis (EEP).

Material e Métodos

Foram utilizados 32 isolados de *S. aureus* provenientes de amostras recolhidas na região do Alentejo-Portugal (22 isolados recolhidos no ano de 2007 e 10 isolados em 2017) e duas estirpes ATCC, *S. aureus* 29213 e *S. aureus* 25923. Nestes, foi testada a ação antimicrobiana, pelo método de difusão em disco (CLSI 2015), de 16 antimicrobianos: Ampicilina (10 µg); Gentamicina (10 µg); Lincomicina (02 µg); Trimetoprim/Sulfametoxazol 1:19 (25 µg); Penicilina (10 ui); Estreptomicina (10 µg); Tetraciclina (30 µg); Cloxacilina (05 µg); Neomicina (30 µg); Cefazolina (30 µg); Cefoperazone (30 µg); Cefalexina (30 µg); Amoxicilina + Ácido Clavulânico (30 µg); Oxacilina (01 µg); Ceftriaxona (30 µg) e Ciprofloxacina (05 µg). Foi também investigada a presença do gene *blaZ*, que determina a resistência aos antibióticos β-lactâmicos, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram preparados EEP a partir de sete amostras de própolis recolhidas em quatro Estados do Brasil e denominadas pela cor, sendo: Verde (V) e Castanha3 (C3) colhidas no Estado de Minas Gerais; Vermelha1 (Vm1) e Vermelha2 (Vm2) em Alagoas; Castanha1 (C1) e Castanha2 (C2) no Estado do Ceará e Castanha4 (C4) em Pernambuco. A própolis Castanha5 (C5) foi colhida na região do Alentejo em Portugal. Foram utilizados para preparação dos extratos, 300g da própolis bruta em 700ml de etanol a 70%. A ação antimicrobiana desses extratos foi analisada pelo método das microdiluições, em triplicado, para as concentrações entre 0,05 e 214,0 mg/mL.

Resultados

No teste de suscetibilidade a antimicrobianos, a Cloxacilina revelou a maior taxa de resistência (18,7%), seguida da Penicilina (12,5%), Ampicilina e Tetraciclina (9,4%) e Neomicina (3,1%), tendo os restantes fármacos revelado eficiência face a todos os isolados. Apenas três (9,4%) isolados colhidos em 2017 apresentam o gene *blaZ*, sendo os mesmos resistentes aos antimicrobianos β -lactâmicos Ampicilina, Cloxacilina e Penicilina. Todos os isolados de *S. aureus* testados revelaram 100% de sensibilidade a seis extratos de própolis do Brasil e um de Portugal e 94% de sensibilidade ao extrato C4 do Brasil, variando conforme as concentrações. As bactérias mostraram sensibilidade: entre 0,4 e 3,3 mg/mL ao EEP Vm1; entre 0,4 e 6,6 mg/mL ao extrato Vm2; entre 0,8 e 6,6 mg/mL aos extratos V, C1 e C3; entre 1,6 e 6,6 mg/mL ao extrato C2; entre 1,6 e 13,3 mg/mL ao extrato C5 e entre 13,3 e 214 mg/mL ao extrato C4. Os três isolados resistentes aos β -lactâmicos foram sensíveis a todos os oito EEP aqui estudados, nas concentrações entre 0,4 a 53,5 mg/mL. Os extratos Vm1 e Vm2 exibiram a melhor atividade antimicrobiana, tendo inibido os isolados testados em menor concentração relativamente aos outros extratos. O EEP de Portugal C5 revelou ação semelhante aos extratos de própolis de cor castanha colhidas no Brasil. O extrato C4 apenas produziu inibição microbiana com a mais elevada concentração, tendo dois isolados revelado resistência para este extrato. A estirpe ATCC 29213 (controlo positivo para o gene *blaZ*) também foi resistente aos mesmos antimicrobianos β -lactâmicos e foi sensível aos EEP nas concentrações entre 0,8 e 214 mg/mL. A estirpe ATCC 25923 (controlo negativo para o gene *blaZ*) foi sensível aos antimicrobianos β -lactâmicos, mas também aos diferentes EEP, no mesmo intervalo de concentração que a estirpe ATCC 29213. Trinta e um por cento dos isolados adquiridos em 2007 apresentaram resistência a um dos antimicrobianos testados, porém 40% dos isolados obtidos em 2017 foram resistentes de um a quatro antimicrobianos.

Conclusão

Este trabalho revelou um aumento de resistências apreciável entre 2007 e 2017, relativamente a isolados de *S. aureus* de origem leiteira em pequenos ruminantes, salientando a importância de desenvolver terapêuticas alternativas ao uso de antimicrobianos. Os extratos etanólicos de própolis exibiram uma ação antimicrobiana considerável face aos mesmos isolados, podendo vir a constituir uma valiosa opção para o controlo desta doença com notórias vantagens para a saúde pública.

Palavras-chave: Leite, Resistência a antimicrobianos, Própolis, Saúde pública.

Referências

- Contreras A. *et al.* (2007) Mastitis in small ruminants. *Small Rum. Res.*, 68:145–153.
- Lee J.H. (2003) Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. environ. microbiol.*, 69:6489–6494. DOI: 10.1128/AEM.69.11.6489–6494.2003.
- Martins K.B. *et al.* (2017) Characteristics of resistance and virulence factors in different species of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of healthy sheep and animals with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 100:2184–2195. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11583>.
- Virdis S. *et al.* (2010) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. *Veterinary Medicine International*, ID 517060, 6 pages. <https://doi:10.4061/2010/517060>.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pelo conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil (CNPq) e por Fundos Nacionais portugueses através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do Projecto UID/AGR/00115/2013. M. Laranja agradece a bolsa de Pós-Doutoramento da FCT (SFRH/BPD/108802/2015).