

Atividade antimicrobiana da geoprópolis da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) contra bactérias isoladas em leite de vacas mestiças leiteiras com mastite

(Antimicrobial activity of bee geopropolis of jataí (Tetragonisca angustula) against bacteria isolated from crossbred cows milk with mastitis)

Cintia Raye Maciel, Carlos Augusto Constancio Bastos, Roberta Rollemberg Cabral Martins, Denise de Mello Bobany¹

¹Correspondência: cintiaraye@yahoo.com.br

RESUMO: A mastite é responsável por perdas consideráveis aos produtores e às indústrias. A utilização de terapias convencionais tem resultado em resistência por parte dos microrganismos além de resíduos eliminados no leite, interferindo na produção de laticínios e na saúde pública. Na busca por terapias alternativas, particularmente os apiterápicos tem demonstrado bons resultados frente a diferentes microrganismos causadores de enfermidades. Em um experimento com 10 amostras de leite de animais positivos ao teste de CMT onde sete apresentaram crescimento bacteriano, verificou-se a eficácia *in vitro* da geoprópolis da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) contra bactérias patogênicas isoladas e identificadas nessas amostras como *Stapylococcus sp.* coagulase-negativos.

Palavras-chave: apiterapia; bovinos; doença da mama; própolis

ABSTRACT: The mastitis is responsible for considerable losses to the producers and to the industries. The use of conventional therapies has been made resistance for part of the microorganisms besides residues found in the milk, interfering in the production of dairy products and in the public health. The demand of alternative therapies, particularly the apiterapy, has been demonstrating good results in front of different microorganisms which caused illnesses. In a experiment with 10 samples of milk of positive animals to the CMT test when seven presented bacterial growth, it was found the efficiency *in vitro* of the geopropolis of the bee Jatai (*Tetragonisca angustula*) against *Stapylococcus sp.* coagulase-negatives.

Key Words: apitherapy; bovine; breast disease; propolis

INTRODUÇÃO

O leite consiste em uma das principais fontes de proteína para a população humana e, devido a isso, há uma preocupação constante com a sua qualidade. A mastite, definida como a inflamação da glândula mamária, considerada, sob o ponto de vista econômico, como a doença mais relevante de bovinos leiteiros em todos os continentes, exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e sobre as características físico-químicas deste produto (Costa *et al.* 2008).

A etiologia complexa e multivariada da mastite composta, principalmente, por *Staphylococcus coagulase positivos*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus coagulase negativos* entre outros, transmitidos, principalmente, durante a ordenha (Yamamura *et al.* 2007; Costa, 2008) exige um controle rigoroso no sentido da erradicação desses microorganismos contagiosos e a manutenção de baixos índices de mastite ambiental (Müller, 2002; Ribeiro *et al.* 2009).

O tratamento ideal da mastite seria aquele que eliminasse todos os processos infecciosos do úbere sem qualquer alteração no leite (Pinto, 2000; Pinto *et al.*, 2001; Nader Filho *et al.* 2007), já que, de acordo com Batista *et al.* (2008) e Ribeiro *et al.* (2009), o resíduo de drogas antimicrobianas pode gerar um impacto no desenvolvimento de bezerras alimentadas com leite de vacas em tratamento podendo surgir, ao longo do tempo, resistência bacteriana e/ou reações adversas.

Desse modo, a demanda por novas formas de criações utilizando um manejo voltado para prevenção de doenças e que preconize o uso de terapêuticas mais suaves, como as terapias alternativas, são consideradas, se contrapondo aos modelos

convencionais de criação com a utilização de medicamentos alopáticos (Honorato, 2006). As terapias alternativas, economicamente viáveis, socialmente justas e ambientalmente corretas podem gerar uma relação equilibrada entre os fatores ambientais, socioculturais e econômicos (Villavicencio *et al.* 2007; Costa; Araújo, 2009).

A apicultura é considerada uma das atividades agrícolas que mais crescem no Brasil nas últimas décadas se tornando uma das que mais realiza a inclusão social no setor agropecuário, aliando crescimento e expansão da produção apícola à utilização desses produtos para uso terapêutico (Trovo; Silva; Leão, 2003).

Dentre os produtos das abelhas, do gênero *Apis*, mais conhecidos destacam-se o mel e a própolis, essa última já bastante utilizada para diferentes fins terapêuticos, com ações antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas (Duarte *et al.* 2003), antitumorais, citotóxicas (Torres *et al.* 2008), antivirais (Lustosa *et al.* 2008), antioxidantes, imunomodulatórias e antiúlcera (Sousa *et al.* 2007) devidamente comprovadas.

De acordo com Loguercio *et al.* (2006) o extrato de própolis possui efeito antimicrobiano em 90,5% das amostras bacterianas testadas, contra *Staphylococcus coagulase-positivo* e *Streptococcus sp.*, isolados em casos de mastite bovina, possuindo efeitos superiores à antimicrobianos comumente utilizados para tratamento dessa enfermidade. Silva *et al.* (2008) concluíram, após isolamento bacteriano de microrganismos patogênicos em mastite, que a própolis possui capacidade de inibir o crescimento da *Pasteurella sp.* e *Staphylococcus coagulase-positivo* e Borges *et al.* (2014) encontraram cerca de 75% da atividade inibitória do controle-positivo

(gentamicina) frente ao *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp..

Abelhas sem ferrão produzem geoprópolis, com as mesmas funções na colmeia que a própolis das *Apis* como vedação de colmeias e proteção de ninhos (Dutra *et al.* 2008) e uma espécie de abelha indígena sem ferrão (*Tetragonisca angustula*) popularmente conhecida como abelha Jataí, é particularmente interessante pois, segundo Miorim *et al.* (2003), a geoprópolis e o mel dessa abelha possuem atividades antimicrobianas contra bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, efeitos atribuídos a diversos compostos polifenólicos que possui (Sousa *et al.* 2007; Lustosa *et al.*, 2008).

Conforme resultados observados por Silva *et al.* (2008), a geoprópolis da espécie *Melipona subnitida*, da mesma família que a *Tetragonisca angustula* inibiu o crescimento de *Bacillus* sp., *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* coagulase-negativa e *Staphylococcus* coagulase-positiva isolados em leite de vacas com mastite subclínica.

Este trabalho tem como objetivo verificar *in vitro* a atividade antibacteriana da geoprópolis da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) contra bactérias patogênicas isoladas em leite de vacas com mastite.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência e coleta das amostras

As amostras de leite foram obtidas de 10 vacas de um rebanho localizado na Propriedade Rancho Ferradura, no município do Carmo, estado do Rio de Janeiro. A criação era formada por animais mestiços, de várias idades, criados em sistema semi-intensivo, utilizando ordenha manual e em diferentes estágios de lactação.

Antes da ordenha as vacas foram submetidas à limpeza dos tetos com água e sabão, secas com papel toalha e submetidas ao processo de antissepsia com álcool 70%. Posteriormente cada teto foi imerso em álcool iodado a 10% e, em seguida, desprezado o primeiro jato. Foram colhidas 40 amostras de leite, correspondendo aos quatro tetos de cada vaca e realizado o California Mastitis Test (CMT) kit Faetec, de acordo com a recomendação do fabricante, para identificação dos tetos comprometidos pela mastite. No intervalo entre os testes, era feita a desinfecção da raquete com água e sabão neutro e secagem com papel toalha.

Dos animais positivos, foram coletadas amostras com aproximadamente 10 mL de leite, referentes aos 10 tetos mais acometidos, em tubos estéreis, previamente identificados com o nome do animal e respectivo quarto. Dentre essas amostras, duas apresentaram reação leve (+), cinco apresentaram reação moderada (+ +) e três apresentaram reação intensa (+ + +) de acordo com a viscosidade observada no Teste de CMT. Essas amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária do Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO.

Isolamento e identificação dos microrganismos

Uma porção (referente a uma alçada) de cada uma das 10 amostras foi semeada em tubos de ensaio contendo meio de cultura Tripton Soja Caldo (TSB) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, a fim de se observar o crescimento de microrganismos. Posteriormente as colônias obtidas foram submetidas à bacterioscopia (Método de Gram) para evidenciação dos microrganismos

através da observação das características morfo-tintoriais.

Após a identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* sp., foram feitas repicagens em placas de Petri contendo meio de cultura Chapman, sendo incubadas a 37°C por 24 horas, a fim de obter culturas puras para realização de testes antibiograma. Foi realizado novo teste de Gram para confirmação do isolamento bacteriano.

Teste de coagulase

Após isolamento do *Staphylococcus* sp., realizou-se o teste de coagulase onde foram coletadas de 2-4 colônias referentes a cada amostra isolada em meio de cultura Chapman e colocadas em tubo de ensaio juntamente com 0,5mL de plasma de coelho com EDTA pipetados com pipeta estéril, a fim de observar formação de coágulos. Os tubos foram colocados em estufa bacteriológica a 37°C durante 1 hora.

O teste foi repetido em lâmina colocando-se uma porção (referente a uma alçada) de solução salina juntamente com 2-4 colônias referentes a cada uma das amostras presentes em meio Chapman e uma porção de plasma de coelho com EDTA com o mesmo objetivo, fazendo-se uma análise imediata.

Repicagem para TSB

Foi coletada uma colônia de cada amostra isolada em meio de cultura Chapman e feita repicagem para tubos de ensaio contendo meios TSB para obter culturas jovens para realização do antibiograma.

Coleta e diluição da geoprópolis

O recolhimento da geoprópolis foi feito no apiário Serrano, em Teresópolis, a partir da raspagem das colmeias de *Tetragonisca angustula*, principalmente nas paredes internas próximas a tampa, acondicionados em um frasco estéril

com tampa de borracha e, imediatamente, encaminhado ao Laboratório de Microbiologia Veterinária do UNIFESO.

O extrato de geoprópolis foi formulado a partir da metodologia descrita por Park *et al.* (1998) a 80% com zona de inibição de 1,5mm de crescimento microbiano.

Preparo dos discos com extrato de geoprópolis

Os discos de papel de filtro (5 x 1mm de diâmetro) foram obtidos artesanalmente, esterelizados em estufa e impregnados com o extrato de geoprópolis, permanecendo em repouso em placa de Petri lacradas com fita isolante durante 15 minutos para, posteriormente, serem mantidos em estufa a 60°C durante 4 horas para eliminação de qualquer resíduo etanólico de acordo com Park *et al.* (1998).

Antibiograma

Para esse teste foi utilizado o Ágar Mueller-Hinton contido em tubos de ensaio devidamente esterelizados, submetidos à fusão e mantidos em banho-maria a 50°C para permanecerem em estado líquido. Posteriormente, foram adicionados 0,1mL da cultura contida em TSB, referentes a cada amostra, em cada tubo contendo o Ágar Mueller-Hinton, submetidos à homogeneização e vertidos em placas de Petri devidamente identificadas. Após a solidificação do meio contendo a cultura do *Staphylococcus* sp., foram colocados, em cada placa, 4 discos de papel contendo o extrato de geoprópolis e as mesmas incubadas a 37°C por 24 horas a fim de fazer a leitura a partir da medição do halo de sensibilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 24 horas da sementeira pode-se observar presença de turvação nos meios de cultura TSB onde se cultivaram as amostras, o que indicou crescimento microbiano (Figura 1).

A bacterioscopia (teste de Gram) permitiu, por meio da visualização das características morfo-tintoriais a identificação de *Staphylococcus sp.* em todas as amostras analisadas (Figura 2).



Figura 1 – Crescimento microbiano indicado pela turvação em meio de cultura TSB.

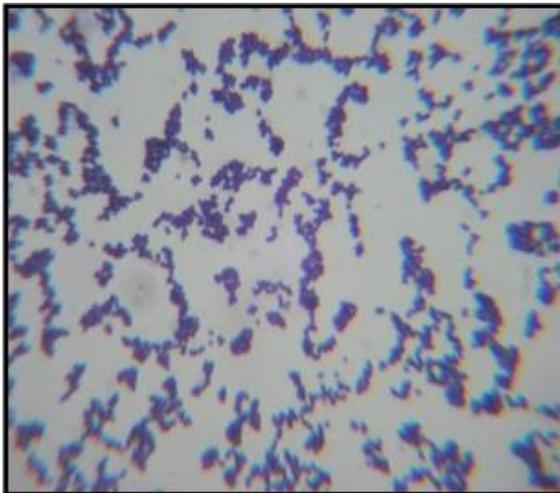


Figura 2 – Fotomicrografia demonstrando a presença do *Staphylococcus sp.* presente no leite de vacas mastíticas.

Da sementeira em meio de cultura Chapman observou-se crescimento bacteriano em 7 das 10 amostras após 24 horas de incubação a 37°C (Figura 3), fato que pode ser

justificado por nem sempre haver crescimento microbiano em amostras positivas ao teste de CMT devido a que o agente patogênico não esteja sendo eliminado de forma contínua dando resultado falso negativo, de acordo com Ribeiro *et al.* (2003). Novamente pode-se confirmar, através da bacterioscopia, a presença de *Staphylococcus sp.*



Figura 3 – Crescimento bacteriano em meio de cultura Chapman.

No teste de coagulase não foram observadas formações de coágulos em nenhuma das amostras analisadas, caracterizando, portanto, o *Staphylococcus sp.* coagulase-negativo. Os tubos retornaram à estufa por mais uma hora para confirmação do resultado novamente dando negativo. A repetição do teste de coagulase em lâmina obteve o mesmo resultado.

A repicagem para meio TSB e a confirmação em lâmina demonstraram o mesmo resultado negativo caracterizando o *Staphylococcus* coagulase-negativo que, de acordo com Yamamura *et al.* (2007) e Costa (2008), é uma das bactérias mais comuns na forma subclínica da doença.

Na realização do antibiograma, não se observou a formação de halo de inibição nas 7 amostras analisadas, sugerindo que o extrato de geoprópolis não fosse eficaz contra bactérias do gênero *Staphylococcus* coagulase-negativa, embora Sousa *et al.* (2007) e

Lustosa *et al.* (2008) tenham constatado essa ação.

Devido a isso, foi realizado novo antibiograma onde a metodologia referente ao preparo dos discos foi modificada. Esses não foram submetidos à estufa a 60°C por 4 horas, e sim impregnados com extrato de geoprópolis e colocados diretamente nas placas de Petri contendo a cultura microbológica em Ágar Mueller-Hinton. Outros discos de papel foram impregnados com álcool de cereais a 96% funcionando como controle. As placas de Petri foram colocadas em estufa a 37°C por 24 horas com o objetivo de observar a formação de halo de inibição. Novamente não se observou sensibilidade do *Staphylococcus* coagulase-negativa ao extrato alcoólico de geoprópolis, o que suscita a necessidade mais testes.

Diante dos resultados negativos anteriores, uma nova metodologia foi adotada na tentativa de confirmar a resistência do *Staphylococcus* coagulase-negativa frente ao extrato de geoprópolis da abelha Jataí e novos repiques da cultura bacteriana em questão foram feitos, a fim de realizar o antibiograma em meio líquido.

Após 24 horas de incubação a 37°C e confirmação do crescimento bacteriano pelo Método de Gram, as amostras foram novamente repicadas, cada uma em dois tubos de ensaio contendo, o primeiro, 1,0mL e o segundo, 0,5mL de extrato de geoprópolis e encubados a 37°C por mais 24 horas a fim de observar se houve, ou não, crescimento bacteriano. Passadas 24 horas, novos repiques foram feitos referentes aos tubos contendo 1,0mL e 0,5mL de extrato de geoprópolis em meio de cultura TSB com o objetivo de observar crescimento microbiano. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C não foi possível observar qualquer turvação no meio, o que sugere a ausência de

microorganismos (Figura 4), o que foi confirmado na bacterioscopia por meio do Teste de Gram onde não foi observada a existência do *Staphylococcus* coagulase-negativa (Figura 5).

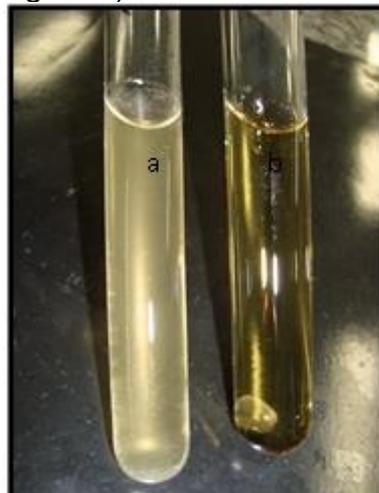


Figura-4—Comparação do antibiograma com aspecto turvo (a) em relação uma cultura microbiana com aspecto límpido (b).



Figura 5 – Bacterioscopia revelando a ausência de *Staphylococcus* coagulase-negativa.

Nesse teste, houve eficácia do extrato de geoprópolis de *Tetragonisca angustula* frente bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativa, a semelhança da geoprópolis de outras abelhas indígenas como a *Melipona subnitida*, efetiva contra várias bactérias, particularmente o *Staphylococcus* coagulase-negativa presente em mastite bovina testada por Silva *et al.* (2008).

A diversidade de resultados encontrados frente às diferentes metodologias aplicadas na confecção do antibiograma leva a hipótese de que algo interferiu durante a impregnação dos discos de papel e sua colocação sobre o Ágar Mueller-Hinton contendo a cultura bacteriana. Possivelmente, a presença de algum composto na geoprópolis da abelha *Tetragonisca angustula* pode ter interferido na impregnação dos discos, já que, quando o extrato do geoprópolis foi colocado em meio líquido, sua eficácia antimicrobiana foi demonstrada, provavelmente devido à possibilidade de sua expansão por toda cultura bacteriana.

CONCLUSÃO

Para que seja utilizado como tratamento alternativo, devem ser realizados novos estudos com relação à composição e propriedades da geoprópolis, já que foram obtidos resultados divergentes nas diferentes metodologias utilizadas.

NOTAS INFORMATIVAS

Este trabalho, protocolado nº 0245/2008, foi aprovado pela Comissão de Ética no Trato com Animais da FESO, em reunião ordinária realizada em 13/02/2009.

REFERÊNCIAS

BATISTA, C.G.; COELHO, S.G.; RABELO, E.; LANA, A.M.Q.; CARVALHO, A.U.; REIS, R.B.; SATURNINO, H.M.. Desempenho e saúde de bezerras alimentadas com leite sem resíduo de drogas antimicrobianas ou leite de vacas tratadas contra mastite adicionado ou não de probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**,

Belo Horizonte, v.60, n 1, p.185-191, 2008.

COSTA, G.M.. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais**. 2008. 123f. Tese (Doutor em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, G.M.; SILVA, N.; ROSA, C.A.; FIGUEIREDO, H.C.P.; PEREIRA, U.P.. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.1938-1942, 2008.

COSTA, N.C.; ARAÚJO, R.L.; FREITAS, G.B.L. Homeopatia: um campo terapêutico fundamental no cuidado veterinário de animais de produção. **Revista Salus-Guarapuava (PR)**, v.3; n.2, p. 75-89, 2009.

DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A.M.C.; MARQUES, R.R.O.; COSTA, M.C.P.; RIBEIRO, M.N.S.. A valiação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557-562, 2008.

HONORATO, L.A.. **A interação humano-animal e o uso de hemeopatia em bovinos de leite**. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A.C.. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.2, p.347-349, 2006.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J.. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia.

Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

MIORIM, P.L.; LEVY JR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C.. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.5, p. 913-920, 2003.

MÜLLER, E.E.. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2002, Toledo. **Anais...** Toledo: NUPEL, 2002. p.206-217.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JR, O.D.; OLIVEIRA, R.P.. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.1, p.1-4, 2007.

PARK, Y.K.; IKEGAKIM, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F.. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998.

PINTO, M.S.. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite**. 2000. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M.. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.;

SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.1, p.52-58, 2009.

SILVA, R.B.; LIMA, P.M.; FERRAZ, R.E.O.; ALVES, N.D.; FEIJÓ, F.M.C.. Efeito "in vitro" de extrato alcoólico de própolis e geoprópolis sobre bactérias patogênicas isoladas de leite bovino mastítico. **Revista CFMV**, n.43, p. 48-54, 2008.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K.. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, p.85-93, 2007.

TORRES, R.N.S.; LOPES, J.A.D.; MOITA NETO, J.M.; CITÓ, A.M.G.L.. Constituintes voláteis da própolis Piauiense. **Química Nova**, v.31, n.3, p.479-485, 2008.

TROVO, M.M.; SILVA, M.J.P; LEÃO, E.R.. Terapias alternativas/complementares no ensino público e privado: análise do conhecimento dos acadêmicos de enfermagem. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.11, n.4, p.483-489, 2003.

VILLAVICENCIO, J.L.E.; ESPINOSA, A.P.; SERRANO, N.A.; TRUJILLO, A.G.; PEÑA, R.L.; PÉREZ, R.O.; AMADOR, B.M.. La ganadería orgánica, una alternativa de desarrollo pecuario para algunas regiones de México: una revisión. **Interciencia**, v.32, n.6, p.385-390, 2007.

YAMAMURA, A.A.M.; MULLER, E.E.; GIORDANO, L.G.P.; CONSENZA, M.; SILVA, P.F.N.; GODOY, A.. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de

expansão e do ambiente dos animais.

Semina: Ciências Agrárias, Londrina,
v.28, n.1, p.105-114, 2007.