

# USO DA PRÓPOLIS NO CONTROLE *in vitro* DA BACTÉRIA GRAM-POSITIVA *Staphylococcus aureus* CAUSADORA DA MASTITE EM VACAS LEITEIRAS<sup>1</sup>

MARCELO DE SOUSA BARBOSA<sup>2</sup>, GUSTAVO HARALAMPIDOU DA COSTA VIEIRA<sup>2\*</sup>, WAGNER DA PAZ ANDRADE<sup>2</sup>, DIÓGENES MARTINS BARDIVIESSO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 17/09/13. Aceito para publicação em 08/04/14.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Cassilândia, MS, Brasil.

\*Autor correspondente: [gcv@uems.br](mailto:gcv@uems.br)

**RESUMO:** As bactérias Gram-positivas *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* são as principais causadoras da mastite em vacas leiteiras. Estima-se que as perdas anuais causadas por essa doença chegam a 35 bilhões de dólares. Considerando a segurança de alimentos, o presente trabalho objetivou determinar o potencial da própolis no combate a bactéria *Staphylococcus aureus*, causadora da mastite bovina, visto que, os tratamentos convencionais a base de antibióticos, se administrados de maneira incorreta e se não forem respeitados os períodos de carência, podem deixar resíduos no leite. Para tanto, cepas da bactéria foram isoladas do leite de vacas portadoras, identificadas através de testes de CMT (California Mastit Test) e mantidas em ágar nutriente a 37°C. A atividade antimicrobiana da própolis foi determinada através do desenvolvimento colonial da bactéria em meio de cultura com a referida substância nas concentrações de 2, 4, 8 e 16 mL/L de água destilada. O diâmetro médio da colônia bacteriana submetida a concentração de 2 mL/L de extrato etanólico de própolis (EEP) variou de 2,19 a 3,11cm, enquanto que na concentração de 4 mL/L o crescimento observado foi de 1,44 a 1,81. Para as concentrações de 8 e 16 mL/L os crescimentos foram de 0,69 a 0,90 cm e 0,41 a 0,55 cm, respectivamente. A própolis possui ação inibitória *in vitro* sobre a bactéria estudada causadora da mastite, sendo uma alternativa para estudos *in vivo* do tratamento em substituição aos bactericidas convencionais.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, atividade bactericida, mastite subclínica, produção orgânica de leite.

## USE OF PROPOLIS IN *in vitro* CONTROL OF GRAM-POSITIVE BACTERIUM *Staphylococcus aureus* CAUSING MASTITIS IN DAIRY COWS

**ABSTRACT:** Gram-positive bacteria *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* are the main mastitis causes in dairy cows. It is estimated that the annual losses caused by this disease amount to 35 billion dollars. Considering food safety, the present work aimed to determine the potential of propolis against *Staphylococcus aureus* bacterium that causes bovine mastitis, since conventional treatments based on antibiotics if administered incorrectly and if they don't respect the grace periods, can leave residues in milk. Bacterium strains were isolated from milk of susceptible cows, identified through CMT tests (California Mastit Test) and maintained in agar nutrient at 37°C. The antimicrobial activity of propolis was determined through colonial development of the bacterium in a culture medium with this substance in concentrations of 2, 4, 8, and 16 mL/L of distilled water. The average diameter of the bacterial colony subjected to 2 mL/L propolis ethanolic extract (EEP) concentration varied from 2.19 to 3.11 cm, while at a concentration of 4 mL/L was observed a growth from 1.44 to 1.81. For concentrations of 8 and 16 mL/L the growths were from 0.69 to 0.90 cm and 0.55 to 0.41 cm, respectively. Propolis has an inhibitory action *in vitro* on studied mastitis-causing bacteria, being an alternative for *in vivo* studies of treatment instead conventional bactericides.

Keywords: *Apis mellifera*, bactericidal activity, subclinical mastitis, organic milk production.

## INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma enfermidade complexa, resultado de interações entre ambiente, hospedeiro e micro-organismo (FONTANA *et al.*, 2012). Dentre os patógenos causadores da mastite *staphylococcus aureus* é reconhecido como o principal agente causal, sendo ainda potencialmente responsável por alguns tipos de intoxicações no homem, estando ainda relacionado a vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos (LAMAITA *et al.*, 2005). Essa doença é a principal responsável pelos prejuízos econômicos causados aos produtores de leite do mundo inteiro (SILVA *et al.*, 2012).

O procedimento mais comum no tratamento da mastite é o uso de antibióticos, responsáveis por deixar resíduos químicos no leite e promover o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes. Estes fatores têm estimulado a busca por métodos alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas (PINTO *et al.*, 2001). Neste sentido, medicamentos fitoterápicos e homeopáticos, entre outros, têm sido amplamente usados, ainda que em muitos casos a substância testada não apresente respaldo científico acerca da eficácia de ação contra os agentes causadores da enfermidade.

Dentre os produtos naturais usados no combate a microrganismos patogênicos merece destaque a própolis, cujas propriedades têm despertado o interesse de muitos pesquisadores ao redor do mundo (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; BANSKOTA *et al.*, 2000; SFORCIN *et al.*, 2000; MARCUCCI *et al.*, 2001). Este produto constitui uma série de substâncias resinosas e balsâmicas, que são coletadas pelas abelhas em diversas partes vegetais como brotos, botões florais e exsudados resinosos (BURDOCK, 1998).

A maioria dos trabalhos que ressaltam as propriedades da própolis sugere que os diversos tipos de extratos de própolis possuem acentuada ação inibidora *in vitro* sobre gêneros Gram-positivos e em menor escala, sobre as bactérias Gram-negativas. As reconhecidas capacidades antiinflamatória e imunomodulatória dessa substância também servem de estímulo para as investigações acerca da sua utilização em processos inflamatórios, como a mastite bovina (PINTO *et al.*, 2001).

Existem poucos trabalhos na literatura científica sobre o uso de extratos de própolis no tratamento ou prevenção da mastite bovina ou de outras espécies domésticas, sendo o primeiro relato realizado por volta de 1980 (PINTO *et al.*, 2001). Considerando a importância do leite como fonte de alimento, o presente trabalho objetivou determinar o potencial

inibitório *in vitro* da própolis sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*, causadora da mastite em vacas leiteiras.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Apicultura da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul.

O isolamento da bactéria foi feito a partir do diagnóstico da mastite através de coletas mensais de amostras de leite, submetidas ao teste de CMT (California Mastit Test). As vacas foram escolhidas aleatoriamente em propriedades rurais do município de Cassilândia/MS. As bactérias foram oriundas de 28 vacas com CMT positivo, sendo mantidas em placas de petri com ágar nutriente a temperatura de 35 a 37°C por 48 horas, conforme HADACEK e GREGER (2000).

As placas com as colônias bacterianas foram submetidas aos testes de coagulase, catalase, DNase e coloração de Gram para confirmação da ocorrência de *S. aureus*. As colônias puras foram selecionadas, repicadas e mantidas em BOD, sendo usadas para os testes com a própolis.

Todos os procedimentos foram realizados em ambiente asséptico (câmara de fluxo laminar). As colônias puras foram usadas posteriormente para a realização dos testes com o extrato etanólico de própolis (EEP).

A própolis foi produzida com auxílio de coletores de própolis inteligente (CPI), conforme metodologia desenvolvida pelo Sr. Adomar Jesus de Carvalho. Os coletores foram instalados em cinco colméias de *Apis mellifera* mantidas em área de cerrado no município de Cassilândia/MS (19°06'48" S; 51°44'03" W). Após a coleta a própolis foi diluída em álcool de cereais na concentração de 30%, obtendo-se assim o extrato etanólico de própolis (EEP).

A atividade antimicrobiana da própolis foi determinada através do desenvolvimento colonial da bactéria em ágar nutriente acrescido da referida substância nas concentrações de 0, 2, 4, 8 e 16 mL/L. Todas as placas foram mantidas em BOD a 37°C.

As avaliações foram realizadas através de medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), realizadas com auxílio de um paquímetro digital, em três períodos de incubação, 48, 96 e 120 horas após a inoculação.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos (5 concentrações de própolis + fungicida), com

5 repetições, perfazendo um total de trinta colônias testadas. Para comparação de médias foram utilizadas duas testemunhas, sendo uma positiva (+) composta pelo meio de cultura apenas e outra negativa (-), composta por ágar nutriente + bactericida Mastifim®. As variáveis foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise de regressão foi usada para determinar a relação estabelecida entre as doses de própolis e o desenvolvimento da bactéria *S. aureus*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A própolis apresentou ação inibitória sobre a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Para a dose de 2 mL/L, os valores de crescimento colonial variaram de 0,8 a 5,2 cm, enquanto que na concentração de 4 mL/L os valores foram de 0,80 a 2,53. Para as concentrações de 8 e 16 mL/L os crescimentos observados foram de 0,50 a 2,06 cm e 0,57 a 0,47 cm, respectivamente. Todos os valores de crescimento submetidos aos tratamentos com a própolis foram inferiores ao grupo controle (Tabela 1).

Considerando os valores de crescimento micelial para cada período de observação, nota-se que na primeira avaliação, os resultados obtidos nos tratamentos com própolis não diferiram do bactericida, sendo os menores valores de crescimento obtidos para as duas maiores concentrações de própolis testadas. Para a segunda avaliação, realizada após 48h da inoculação do

patógeno, as duas maiores doses de própolis, que correspondem a 8 e 16 mL/L não diferiram do resultado obtido com o bactericida. No último período de observação, apenas a maior dose de própolis apresentou resultados semelhantes ao bactericida.

Quando observado o efeito inibitório de cada concentração de própolis ao longo dos períodos de observação, nota-se que para a maior dose de própolis testada os valores de crescimento colonial não diferem entre si nos três períodos observados, reforçando que a própolis nesta concentração é eficiente no controle de *S. aureus*, podendo ser indicada nos programas alternativos de tratamento da mastite. Nos demais tratamentos a colônia bacteriana apresentou discreto desenvolvimento ao longo do tempo, sugerindo que as concentrações inferiores a 16 mL/L, embora influenciem de forma negativa o desenvolvimento de *S. aureus*, não atingiram resultados suficientes para recomendação no tratamento dessa enfermidade.

Os valores de crescimento colonial apresentados na Tabela 1 sugerem que a inibição de *S. aureus* pela própolis apresenta uma relação dependente, sendo os valores de crescimento da colônia bacteriana inversamente proporcional ao aumento das doses de própolis usadas.

Essa relação dose dependente fica também evidente na Figura 1. As curvas de crescimento obtidas nas análises de regressão para cada período de observação decresceram com o aumento das doses de própolis, sendo a relação altamente significativa, sugerindo que *S. aureus* é inibido pela própolis.

**Tabela 1. Valores obtidos para o crescimento colonial (cm) de *Staphylococcus aureus*, em ágar nutriente acrescido de diferentes concentrações de própolis**

Tratamentos	Desenvolvimento da colônia (cm) em três períodos após a inoculação		
	48h	96h	120h
Bactericida	0,00 Aa	0,00 Aa	0,00 Aa
Controle (ausência de própolis)	9,00 Ba	9,00 Da	9,00 Da
2 mL/L de extrato de própolis	0,80 Aa	3,23 Cb	5,20 Cc
4 mL/L de extrato de própolis	0,80 Aa	1,43 Ba	2,53 Bb
8 mL/L de extrato de própolis	0,50 Aa	0,75 ABa	2,06 Bb
16 mL/L de extrato de própolis	0,57 Aa	0,51 ABa	0,47 Aa
CV (%)	5,98	12,63	19,54

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na literatura são muitos os trabalhos que reportam a atividade bactericida da própolis. MERESTA e MERESTA (1985) e MERESTA *et al.* (1989) determinaram o efeito da própolis sobre bactérias causadoras da mastite, sugerindo seu uso no tratamento dessa enfermidade nos casos em que ocorre resistência desses patógenos aos tratamentos com antibióticos convencionais.

Outros estudos que relataram a eficiência da própolis sobre *S. aureus* foram realizados por CABRAL *et al.* (2009), PROBST *et al.* (2011) e MONZOTE *et al.* (2012). CABRAL *et al.* (2009) observaram que a própolis vermelha produzida no nordeste brasileiro é altamente eficiente no controle de *S. aureus*. PROBST *et al.* (2011) determinaram a concentração mínima inibitória da própolis sobre as bactérias *S. aureus* e *Escherichia coli*, obtendo os valores de 1,86 e 20,12 mg/mL, respectivamente.

MONZOTE *et al.* (2012) determinaram o efeito inibitório de vinte amostras de própolis sob bactérias gram-positivas e gram-negativas, relatando que essa substância inibe o crescimento colonial de *S. aureus*, mesmo em pequenas concentrações.

Na literatura há relatos de estudos que evidenciaram o efeito bactericida da própolis sobre outros tipos de bactérias. MULI e MAINGI (2007) determinaram o efeito dessa substância proveniente de diferentes regiões do Quênia sobre as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, encontrando resultados positivos, com maior efeito sobre as duas últimas. OLIVEIRA *et al.* (2010) determinaram a atividade bactericida da própolis brasileira sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* e *Escherichia coli*, observando que essa substância pode ser usada no controle desses microrganismos.

BASTOS *et al.* (2011) obtiveram a inibição completa da bactéria *Escherichia coli* exposta a 7 amostras de própolis marrom produzidas em diferentes regiões do Estado de Mato Grosso e MAEKAWA *et al.* (2013) estudaram o efeito da própolis sobre bactérias causadoras de infecções bucais, observando que a bactéria *Enterococcus faecalis* é inibida por essa substância.

A eficiência bactericida da própolis apresentada neste trabalho e relatada em vários estudos se deve principalmente à presença de compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides (SALOMÃO *et al.*, 2008). Quanto ao mecanismo de ação, TAKAISI-KIKUNI e SCHILCHER (1994), explicaram que essa substância interfere no processo de divisão celular, produzindo defeitos na estrutura da parede celular, causando bacteriólise parcial e formação de bactérias

pseudomulticelulares (policarióticos). Além desses efeitos a própolis desorganiza o citoplasma, caracterizado pela presença de espaços vazios ou estruturas fibrosas, além de causar alterações na membrana citoplasmática e inibir a síntese protéica.

## CONCLUSÃO

Considerando a atividade da própolis contra esses patógenos da mastite, estudos *in vivo* e a caracterização química devem ser realizados, além da determinação dos aspectos toxicológicos do extrato da própolis.

## AGRADECIMENTOS

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 239-246, 2000.
- BASTOS, E.M.A.F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E.M.; SCOARIS, D.O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, p.1255-1259, 2011.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v.36, p.347-363, 1998.
- CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, v.32, p.1523-1527, 2009.
- FONTANA, V.L.D.S.; GIANINNI, M.J.S.M.; FONTANA, C.A.P.; LEITE, C.Q.F.; STELLA, A.E. Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.79, p.469-476, 2012.
- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, v.11, p.137-147, 2000.



- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, YU.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p. 235 – 240, 1999.
- LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. *Staphylococcus* sp. counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.702-709, 2005.
- MAEKAWA, L.E.; VALERA, M.C.; OLIVEIRA, L.D.; CARVALHO, C.A.T.; CAMARGO, C.H.R.; JORGE, A.O.C. Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, v.21, p.25-31, 2013.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P. H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.105–112, 2001.
- MERESTA, L.; MERESTA, T. Sensitivity of bovine mastitis bacteria to propolis *in vitro*. **Medycyna Weterinaryjna**, v. 41, p.489-492, 1985.
- MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using an extract of propolis. **Medycyna Weterinaryjna**, v. 45, p. 392-395, 1989.
- MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M.C.; HERNANDEZ, I.M.; FRAGA, J.; PÉREZ, K.; KERSTENS, M.; MAES, L.; COS, P. *In vitro* antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, p.978-984, 2012.
- MULI, E.M.; MAINGI, J.M. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. **Journal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases**, v.13, p.655-663, 2007.
- OLIVEIRA, A.P.; FRANÇA, H.S.; KUSTER, R.M.; TEIXEIRA, L.A.; ROCHA, L.M. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.16, p.121-130, 2010.
- 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.278-283, 2001.
- PROBST, I.S.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JR., A. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural product. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.17, p. 159-167, 2011.
- SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R.; CAMPOS, L. C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C.; de CASTRO, S.L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, p. 317-324, 2008.
- SFORCIN, J.M.; FERNANDES JR., A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.243–249, 2000.
- SILVA, E.R.; PEREIRA, A.M.G.; MORAES, W.S.; SANTORO, K.R.; SILVA, T.R.M. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, p. 701-711, 2012.
- TAKAISI-KIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**, v.60, p.222-227, 1994.