



AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA APITOXINA CONTRA *STAPHYLOCOCCUS* PROVENIENTES DE LEITE MASTÍTICO

Aline M. F. BALBINO¹; Ana B. S. SANTOS²; Lucas E. O. APARECIDO³; Polyana F. CARDOSO⁴; Poliana C. COLPA⁵; Délcio B. SILVA⁶

RESUMO

A busca por novos fármacos é uma constante, especialmente quando se refere ao tratamento de mastites, já que a maioria dos patógenos apresentam resistência aos antimicrobianos. O veneno de abelha é uma substância que reporta na literatura diversos trabalhos afirmando seu potencial antimicrobiano. Considerando estes aspectos, o objetivo deste projeto foi avaliar a atividade antibacteriana da apitoxina contra bactérias do gênero *Staphylococcus*, causadoras de mastite. O isolamento do agente etiológico e testes para avaliar a ação antibacteriana *in vitro* da apitoxina em quatro diferentes concentrações foram realizados. Os resultados demonstraram que a apitoxina possui ação antibacteriana contra as bactérias do gênero *Staphylococcus*, indicando uma potencial alternativa à terapia com antibióticos.

Palavras-chave:

Abelhas; Produtos-Apícolas; Mastite; Inflamação.

1. INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes problemas sanitários que afetam a bovinocultura leiteira é a mastite (RODRIGUES et al., 2018). Um aspecto importante no controle da mastite é a resistência dos patógenos aos antimicrobianos, que leva não apenas a dificuldade do tratamento, mas também representa um risco para a saúde pública. O gênero *Staphylococcus* é o principal causador das mastites nas diferentes regiões do Brasil, com maior prevalência dos *Staphylococcus* coagulase negativo. Observa-se que a penicilina, ampicilina, amoxicilina e neomicina são os antimicrobianos que os microrganismos causadores de mastite apresentam maior resistência (ACOSTA et al., 2016).

Neste contexto, os diferentes produtos naturais propiciados pela apicultura apresentam bons resultados terapêuticos. Entre as abelhas existentes utilizadas na apicultura, há o gênero *Apis*, como a *Apis mellifera*, que é conhecida como abelha africanizada ou abelha do mel. Essas são comuns e disponibilizam produtos completamente naturais, dentre eles o mel, a geleia-real, a cera, a apitoxina, o pólen, e até mesmo larvas de zangão (MOREIRA, 2012). Dentre os produtos relacionados com as abelhas *Apis mellifera*, destaca-se aqueles com ação antibacteriana já reportada na literatura, como a própolis e a apitoxina (PEREIRA, 2017). Em um estudo realizado por Han et

¹Bolsista PIBIC/CNPq, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: alinemirissan203@gmail.com

²Discente do Bacharelado em Medicina Veterinária, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: 12192001397@muz.ifsuldeminas.edu.br

³Docente, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: lucas.aparecido@muz.ifsuldeminas.edu.br

⁴Biomédica, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: polyana.cardoso@muz.ifsuldeminas.edu.br

⁵Responsável pelo Laboratório de Bromatologia, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: poliana.colpa@muz.ifsuldeminas.edu.br

⁶Orientador, IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho. E-mail: delcio.silva@muz.ifsuldeminas.edu.br

al. (2007), o tratamento com apitoxina coreana demonstrou amplo diâmetro de zona de inibição contra sete patógenos causadores de mastite. A maior efetividade foi contra *Staphylococcus aureus* com uma contagem bacteriana reduzida com menos de 1,0 log UFC/mL depois de 12 horas de incubação.

Portanto, objetivou-se com este projeto avaliar *in vitro* o potencial antibacteriano da apitoxina através da formação de halos de inibição de crescimento bacteriano em cultivos de bactérias do gênero *Staphylococcus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de apitoxina foram adquiridas pela compra do veneno bruto de abelha *Apis mellifera* advindas de floradas de eucalipto, que possuíam em sua composição apamina, fosfolipase e melitina identificadas pela análise de componentes por espectrometria de massa. E as amostras de leite mastítico foram provenientes da rotina de diagnóstico de CMT (california mastitis test) do setor de Bovinocultura Leiteira do IFSULDEMINAS, campus Muzambinho. Através da ordenha manual, o leite obtido foi colocado em frascos estéreis, e logo acondicionado em caixa de isopor com gelo para o envio ao Laboratório de Bromatologia.

A fim de cultivar e isolar o agente, foi utilizado o ágar BP (baird-parker) específico para *Staphylococcus* e o caldo BHI (infusão cérebro coração). Em placas contendo ágar BP foi inoculado cinco diferentes amostras de leite com mastite. Após 48 horas na estufa a 37°C, houve a identificação do crescimento das colônias de *Staphylococcus* e a transferência dos agentes para tubos contendo BHI, que ficaram durante mais 48 horas na estufa. Posteriormente, utilizando a escala de Mcfarland, as bactérias isoladas foram suspensas em solução salina estéril para obtenção de uma turvação idêntica ao tubo 0,5, que se refere a 150 milhões UFC/mL.

Para avaliar a atividade antibacteriana foi usado o método de difusão em ágar pela técnica de perfuração de poços. A apitoxina foi diluída em água destilada nas seguintes concentrações: 3 mg/mL, 7 mg/mL, 11 mg/mL e 15 mg/mL. A suspensão de bactérias foi inoculada nas placas de petri contendo ágar AMH (mueller hinton) e após a absorção do inóculo pelo ágar, foram adicionados 50 uL de cada uma das concentrações de apitoxina nos poços previamente feitos. O controle negativo usado foi 50 uL de água destilada. Em seguida, as amostras foram incubadas invertidas a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente, foi avaliado o desenvolvimento de halos de inibição ao redor dos poços contendo a solução de apitoxina, e então medidos com um paquímetro. O resultado foi considerado positivo na formação de halos a partir de 9mm.

Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística Teste de Tukey, com 95% de confiança, e também foi feita análise de homocedasticidade para verificar se os dados são normais

(TUKEY, 1977).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos dados apresentados na Tabela 1, os resultados indicam que a apiterapia com veneno de abelha (apitoxina) apresentou um efeito significativo no controle do crescimento da bactéria *Staphylococcus* em mastite bovina *in vitro*.

Tabela 1. Influência de diferentes concentrações no crescimento de *Staphylococcus* em mastite bovina *in vitro*.

| Concentrações (mg/mL) | Halo de inibição (mm)* |
|--------------------------|---------------------------|
| 0 | 0 e |
| 3 | 10,477 d |
| 7 | 11,752 c |
| 11 | 12,8603 b |
| 15 | 13,803 a |
| CV: | 21,76* |

*Médias seguidas por letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas, conforme o teste de Tukey, com 95% de confiança. O valor P é de 0.0049.

Foi observado que, com o aumento das concentrações de apitoxina, houve uma elevação nos halos de inibição do crescimento bacteriano, demonstrando um efeito dose-resposta positivo. A ausência de inibição no grupo controle (0 mg/ml) confirma que o efeito inibitório observado está diretamente relacionado ao tratamento com apitoxina.

Esses resultados sugerem que a apitoxina pode ser uma opção promissora para o tratamento de infecções bacterianas causadas por *Staphylococcus* em casos de mastite bovina. Em estudos realizados por Viana (2015), à medida que a concentração de apitoxina foi aumentando ocorreu a ampliação dos halos de inibição do crescimento das bactérias nas placas, efeito igualmente perceptível nos resultados desta pesquisa. Neste mesmo estudo, a menor concentração utilizada foi 3,12 mg/mL que não resultou em atividade antibacteriana, enquanto que na pesquisa em questão a menor concentração foi 3 mg/mL com ação antibacteriana positiva.

Estudos utilizando diferentes amostras de apitoxina, sugerem que o tipo de florada influencia nos níveis dos compostos apamina, fosfolipase e melitina, responsáveis pela ação antibacteriana e anti-inflamatória (PEREIRA, 2017). Na pesquisa anteriormente mencionada, o veneno com maior concentração das substâncias citadas apresentou resultados melhores quanto a ação antibacteriana. Portanto, uma explicação para a variação entre os resultados entre estudos pode

ser a composição do veneno.

Além do uso individual da apitoxina como antimicrobiano, também tem sido considerado o uso sinérgico do veneno de abelha com fármacos, como foi demonstrado por Pereira (2017), combinando a oxacilina o veneno de abelha apresenta efeito bactericida contra cepas de *Staphylococcus*.

5. CONCLUSÃO

Concluiu-se que a apitoxina possui atividade antibacteriana satisfatória *in vitro* contra bactérias do gênero *Staphylococcus* causadoras de mastite. Como demonstrado, o uso da apitoxina apresenta potencial no tratamento da mastite bovina sem efeitos indesejáveis advindos do uso de antimicrobianos. Para tanto, mais estudos *in vivo* são necessários para comprovar o seu efeito rotineiramente.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pela bolsa de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. C. et al. Mastite em Ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.7, 2016.

HAN, et al. Antibacterial Activity of the Honey Bee Venom against Bacterial Mastitis Pathogens Infecting Dairy Cows. **International Journal of Industrial Entomology**. Vol. 14, No. 2, 2007.

MOREIRA, D. R. Apiterapia no tratamento de patologias. **Revista Fapciência**, Apucarana-PR. v.9, n. 4, p. 21 – 29, 2012.

PEREIRA, Ana Flávia Marques. **Ação da própolis, apitoxina e melitina de *Apis mellifera* e suas influências nos fatores de virulência de *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Botucatu - SP, 2017.

RODRIGUES, et al. Mastite Bovina – Influência na Produção, Composição e Rendimento Industrial do Leite e Derivados. **Arquivos de Pesquisa Animal**, Brasil, ano 2018, v. 1, ed. 1, p. 14-36, 2018.

TUKEY, J. W. **Exploratory Data Analysis**. Addison-Wesley, 1977.

VIANA, Geysa Almeida. **Avaliação *in vitro* das atividades biológicas da apitoxina extraída de *Apis mellifera* do Semiárido**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Semiárido. Mossoró - RN, 2015.