

MARCELO SOUZA PINTO

**ATIVIDADE DE PRÓPOLIS VERDE E BOVICINA HC5 SOBRE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

RESUMO

PINTO, Marcelo Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Atividade da própolis verde e da bovicina HC5 sobre bactérias isoladas de mastite bovina.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-orientadores: Célia Alencar de Moraes e Maria Aparecida V. Paiva Brito.

A mastite é a principal doença que afeta o rebanho leiteiro bovino no Brasil e em todo o mundo. A presença de resíduos de antibióticos no leite e o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes são problemas decorrentes do tratamento com antibióticos e têm estimulado a busca por métodos alternativos de controle. Estudos anteriores indicaram o potencial da própolis verde de Minas Gerais e da bovicina HC5 para o controle de bactérias comumente associadas à mastite bovina. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extratos de própolis verde de Minas Gerais e da bovicina HC5 sobre bactérias isoladas de mastite bovina. Os extratos de própolis verde de Minas Gerais obtidos a partir de etanol absoluto (E-EtOH100), etanol 70% (E-EtOH70), metanol (E-MeOH), éter (E-Eter), clorofórmio (E-Clor) e água (E-H₂O) foram caracterizados quanto ao (1) teor de fenólicos, (2) teor de flavonóides, (3) por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) e (4) quanto à atividade antimicrobiana. Uma característica dos compostos fenólicos em todos os extratos da própolis analisados foi a alta proporção de artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxi cinâmico) e outros derivados do ácido cinâmico. O teor de fenóis totais foi 0,77, 0,34, 0,47, 0,46, 0,29 e 0,01% (m/m) nos E-EtOH70, E-EtOH100, E-MeOH, E-Clor, E-Eter e E-H₂O, respectivamente. O teor de flavonóides foi 0,21, 0,12, 0,15, 0,06, 0,04 e 0,03 % (m/m) nos E-EtOH70, E-EtOH100, E-MeOH, E-Clor, E-Eter e E-H₂O, respectivamente. Todos os extratos tiveram atividade inibidora do crescimento do microrganismo indicador (*Staphylococcus* sp. coagulase negativo, isolado 4244), com exceção do E-H₂O. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de difusão em ágar foi determinada em 276 isolados bacterianos (99 *Staphylococcus aureus*, 44 *Staphylococcus* sp.

coagulase-negativo, 71 *Streptococcus agalactiae*, 22 *Streptococcus bovis*, 20 *Streptococcus uberis* e 20 *Escherichia coli*) obtidos de bovinos diagnosticados com mastite clínica e subclínica oriundos de propriedades leiteiras diversas dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo quanto ao extrato E-EtOH70 e à bovicina HC5, uma bacteriocina produzida pelo *Streptococcus bovis* HC5. A maior porcentagem de inibição do E-EtOH70 sobre os isolados foi: *Staphylococcus aureus*, 9,37 mg/ml (51,5%); *Staphylococcus* sp. coagulase negativo 4,68 mg/ml (52,3%); *Streptococcus agalactiae* 9,37 mg/ml (37,5), enquanto que 91% dos isolados de *Streptococcus bovis*; 75% dos isolados de *Streptococcus uberis* e 100% dos isolados de *Escherichia coli* foram resistentes à dose máxima de própolis aplicada (300 mg/ml). A maior porcentagem de inibição da bovicina HC5 sobre os isolados foi: *Staphylococcus aureus*, 640 Unidades Arbitrárias (AU) (29,3%); *Staphylococcus* sp. coagulase negativo 320 AU (24,4%); *Streptococcus agalactiae* 320 AU (27,8%), *Streptococcus bovis* 320 AU (27,3%); *Streptococcus uberis* 160 AU (30 %). Não houve inibição do crescimento de 100% dos isolados de *Escherichia coli* à dose máxima de bovicina HC5 aplicada (2560 AU). As culturas que foram transferidas por aproximadamente 80 gerações na presença de doses subletais de bovicina HC5 e de extrato etanólico de própolis não se tornaram resistentes.

ABSTRACT

PINTO, Marcelo Souza, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2008.
Activity of green propolis and bovicin HC5 on bacteria isolated from bovine mastitis. Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-Advisers: Célia Alencar de Moraes and Maria Aparecida V. Paiva Brito.

Mastitis is the main disease affecting dairy cattle herds in Brazil and worldwide. Antibiotic residues in milk and the appearance of resistant bacterial strains are consequences of antibiotic treatment and have stimulated the search for alternative control methods. Previous studies indicated the potential of green propolis from Minas Gerais and HC5 bovicin to control bacteria commonly associated to bovine mastitis. This work aimed to evaluate the effect of green propolis extracts from Minas Gerais and HC5 bovicin on bacteria isolated from bovine mastitis. The green propolis extracts from Minas Gerais were produced from absolute ethanol (E-EtOH100), 70% ethanol (E-EtOH70), methanol (E-MeOH), ether (E-Ether), chloroform (E-Chlor) and water (E-H₂O) and were characterized based on (1) phenolic content, (2) flavonoid content, (3) gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), and (4) antimicrobial activity. One characteristic of phenolic compounds in all the propolis extracts analyzed was a high content of artepilin C (3,5-diprenil-4-hydroxy cinnamic acid) and other cinnamic acid derivatives. The total content of phenols was 0.77, 0.34, 0.47, 0.46, 0.29 and 0.01% (m/m) in E-EtOH70, E-EtOH100, E-MeOH, E-Chlor, E-Ether and E-H₂O, respectively. Flavonoid contents were 0.21, 0.12, 0.15, 0.06, 0.04 and 0.03 % (m/m) in E-EtOH70, E-EtOH100, E-MeOH, E-Chlor, E-Ether and E-H₂O, respectively. All extracts inhibited the growth of the microorganism indicator (*Staphylococcus* sp. coagulase negative, isolate 4244), except for E-H₂O. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the agar diffusion method was determined in 276 bacterial isolates (99 *Staphylococcus aureus*, 44 *Staphylococcus* sp. coagulase-negative, 71 *Streptococcus agalactiae*, 22 *Streptococcus bovis*, 20 *Streptococcus uberis* and 20 *Escherichia coli*) obtained from bovine diagnosed with clinical and sub-clinical mastitis originated

from several dairy farms in the states of Minas Gerais, Rio de Janeiro and Sao Paulo, when submitted to the extract E-EtOH70 and to HC5 bovicin, a bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* HC5. The highest inhibition percentage of E-EtOH70 over the isolates was: *Staphylococcus aureus*, 9.37 mg/ml (51.5%); *Staphylococcus* sp coagulase negative 4.68 mg/ml (52.3%); *Streptococcus agalactiae* 9.37 mg/ml (37.5) while 91% of the isolates from *Streptococcus bovis*; 75% of the isolates from *Streptococcus uberis* and 100% of the isolates from *Escherichia coli* were resistant to the maximum propolis dosage applied (300 mg/ml). The highest inhibition percentage of HC5 bovicin over the isolates was: *Staphylococcus aureus*, 640 Arbitrary Units (AU) (29.3%); *Staphylococcus* sp. coagulase negative 320 AU (24.4%); *Streptococcus agalactiae* 320 AU (27.8%), *Streptococcus bovis* 320 AU (27.3%); *Streptococcus uberis* 160 AU (30 %). There was no growth inhibition in 100% of the isolates from *Escherichia coli* when the maximum HC5 bovicin (2560 AU) dose was applied. Cultures successively transferred during 80 generations in the presence of sub-lethal doses of HC5 bovicin and ethanolic propolis extract did not become resistant.