



**UNIVERSIDADE DE CUIABÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
DOUTORADO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

THÂMELA CRISTINY SIMÃO ALVES

**OCORRÊNCIA DE MASTITE BOVINA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DO
ESTADO DE MATO GROSSO: ETIOLOGIA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Cuiabá/MT
2022

THÂMELA CRISTINY SIMÃO ALVES

**OCORRÊNCIA DE MASTITE BOVINA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DO
ESTADO DE MATO GROSSO: ETIOLOGIA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Tese apresentada à Universidade de Cuiabá - UNIC,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Scatamburlo
Moreira

Cuiabá/MT
2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A474o Alves, Thâmela Cristiny Simão.
 Ocorrência de mastite bovina em propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso: etiologia e atividade antimicrobiana de substâncias bioativas / Thâmela Cristiny Simão Alves. – Cuiabá, 2022.
 98 f.: il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu*, Universidade de Cuiabá, 2022.
Orientadora: Prof. Dra. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

1. Bovino. 2. Inflamação. 3. Leite. 4. Mastite Bovina. I. Título.

CDU 618.19:619

THÂMELA CRISTINY SIMÃO ALVES

**OCORRÊNCIA DE MASTITE BOVINA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DO
ESTADO DE MATO GROSSO: ETIOLOGIA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Tese apresentada à UNIC, no Doutorado em Biociência Animal, área de concentração em Saúde e Produção Animal nos Biomas Pantanal, Cerrado e Amazônia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
Presidente da Banca (Orientadora)
Universidade Federal de Viçosa (UFV)/
Universidade de Cuiabá (UNIC)

Prof. Dr. Ricardo César Tavares
Carvalho
Universidade de Cuiabá (UNIC)

Profa. Dra. Michele Lunardi
Universidade de Cuiabá (UNIC)

Prof. Dr. Marcelo Henrique dos
Santos
Universidade Federal de Viçosa
(UFV)

Prof. Dr. Fábio Bernardo Schein
Universidade de Cuiabá (UNIC)

Cuiabá, 11 de março de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais Márcio e Célida, meu esposo Patrick e minha amada filha Pietra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por ter me conduzido até aqui, e por toda a força concedida para a concretização deste projeto. Além disso, agradeço a ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas.

Aos meus pais, Célida e Márcio, base de tudo que sou, por tanto amor, por cada oração, por me ensinarem a ter fé, acreditarem no meu potencial e me proporcionarem educação e amor pelos estudos.

Ao meu esposo, Patrick - meu equilíbrio - pela sua incansável boa vontade em me ajudar, por aguentar meus momentos de ansiedade e estresse, e insistir sempre que tudo daria certo, acreditando na minha capacidade para que eu avançasse cada vez mais um pouquinho. Enfim, por estar ao meu lado, sendo muito mais do que se pode esperar.

A minha amada filha Pietra, por existir, por tantos sorrisos, por sua serenidade e me ensinar a ser um pouco melhor a cada dia. Possa eu ser motivo de seu orgulho.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, não somente pelas orientações necessárias para concretização deste trabalho, mas por todo carinho, atenção (ao entender que também tenho marido, filha e uma vida profissional) em todos os momentos, pelo acolhimento maravilhoso enquanto estive em Viçosa para execução de alguns testes; acima de tudo uma pessoa incrível que tive o prazer de encontrar em meu caminho.

Aos professores Dr. Marcelo Henrique dos Santos (Departamento de Química da UVF) por disponibilização das substâncias bioativas utilizados neste trabalho, Dr. Hilário Cuquetto Mantovani pelo auxílio para identificação dos *Bacillus*, Dr. Fábio Schein pela disponibilidade e ajuda imprescindível na microbiologia e Dr. Ricardo César Tavares Carvalho pelo auxílio e pela disponibilização de laboratório para execução de alguns experimentos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade de Cuiabá (UNIC) que estiveram diretamente ligados nesta minha jornada acadêmica, pois neste momento sinto-me confiante para prosseguir.

Além desses, Jéssica, Mariana, Lane e Junnia, integrantes do Laboratório de Doenças Bacterianas – LDBAC/UFV, coordenado pela Profa. Dra. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, pelo suporte para realização de experimentos no laboratório, pela amizade, e contribuição para esta tese, por todo o carinho, pelos conselhos, pela participação direta e indiretamente por trás dos bastidores.

Muito obrigada a todos que de alguma forma participaram desta “construção”.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher"
Cora Coralina

RESUMO

A mastite é um dos principais problemas que acometem a bovinocultura leiteira, ocasionando prejuízos a produtores e laticínios em todo o mundo. O tratamento com antimicrobianos é o mais comum, mas pode ter um custo elevado e favorecer a resistência bacteriana. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano de substâncias bioativas extraídas de plantas e verificar suas associações com antimicrobianos convencionais sobre bactérias isoladas de mastite bovina em propriedades leiteiras do interior do estado de Mato Grosso. Foram examinados 154 animais de três propriedades localizadas nos municípios de Cáceres, Araputanga e Campo Verde. Do total de bovinos examinados, 20,12% (31/154) apresentaram mastite, obtendo 30 isolados bacterianos. Estes foram identificadas por características morfológicas, bioquímicas, reação em cadeia da polimerase (PCR) e pelo Sistema de Identificação Microbiana - Sherlock®. Classificou-se os isolados como sendo 43,3% *Staphylococcus* spp. (13/30), 20% (06/30) confirmados como *Staphylococcus aureus*, seguidos por 3,3% *Streptococcus* spp. (01/30), 6,6% *Streptococcus agalactiae* (02/30), 6,6% *Corynebacterium bovis* (02/30), 3,3% *Enterococcus* spp. (01/30), 3,3% *Bacillus* spp. (01/30), 6,6% *Bacillus cereus* (02/30), 3,3% *Listeria* spp. (01/30) e 3,3% *Nocardia* spp. (1/30). O perfil de resistência foi determinado pelo método de difusão em placas de ágar *Mueller Hinton* e observou-se que *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. apresentaram maior perfil de resistência frente aos antimicrobianos testados. Devido aos resultados encontrados com o isolamento, associado a escassez de estudos com *B. cereus* isolados em mastite, o estudo prosseguiu com estes isolados, para os quais foram determinados o perfil de virulência por PCR, através da amplificação dos genes para hemolisina (*hblA*, *hblC*, *hblD*), citotoxina K, cereulida, regulador pleiotrópico e enterotoxina não hemolítica. A concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e a produção de biofilmes foram avaliadas por densidade ótica, e as associações entre as substâncias bioativas com os antimicrobianos pelo teste de Checkboard. Os dois isolados de *B. cereus* (1 e 2) apresentaram genes de virulência para hemolisina (*hblA*, *hblC*, *hblD*), além da citotoxina K, cereulida e regulador pleiotrópico. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da substância bioativa 7-epiclusianona sobre os dois isolados de *B. cereus*, foi 1,95µg/mL para *B. cereus* 1 e 3,9µg/mL para *B. cereus* 2. A CIM da gutiferona-A para *B. cereus* 1 e 2 correspondeu a 7,81µg/mL e 15,62µg/mL, respectivamente, também apresentando ação bactericida. Os testes de interação entre antimicrobianos e substâncias bioativas revelaram um sinergismo significativo da 7-epiclusianona e gutiferona-A quando associados a β-Lactâmicos como ampicilina e amoxicilina, apresentando ação antimicrobiana para os dois isolados de *B. cereus*. Demonstrou-se também o potencial para reduzir a concentração efetiva destes antimicrobianos convencionais, além da redução da produção de biofilme pela associação ampicilina e gutiferona-A. Os resultados apresentados neste trabalho enfatizam a importância de isolar, identificar e caracterizar agentes causadores da mastite, mesmo os menos frequentes como *B. cereus*, por sua relação com problemas na saúde humana, animal e ambiental; além de apontar alternativas promissoras de tratamento da mastite bovina, as quais irão contribuir para a redução da resistência bacteriana aos antimicrobianos, como também de recidivas da doença no rebanho.

Palavras-chave: *B. cereus*. Fitoterápicos. Bovinocultura de leite. Resistência antimicrobiana. Sinergismo.

ABSTRACT

Mastitis is one of the main problems that beset dairy cattle breeding, occasioning losses to farmers and dairies all around the world. Although the antimicrobial treatment is the commonest, it may be costly, and it contributes to bacterial resistance. This study aimed to evaluate the antimicrobial potential of bioactive substances extracted from plants and assess its associations with conventional antimicrobials on isolated bacteria of cattle mastitis in dairy farms in the countryside of Mato Grosso. It was examined a total of 154 animals from three properties located in the counties of Cáceres, Araputanga and Campo Verde. From the total of cattle examined, 20,12% (31/154) presented mastitis, obtaining 30 bacterial isolates. Such were identified by morphotinctorial and biochemical characteristics, Polymerase Chain Reaction (PCR), and the Sherlock™ Microbial Identification System. The isolates were classified as being 43,3% *Staphylococcus* spp. (13/30), 20% (06/30) were confirmed as *Staphylococcus aureus*, followed by 3,3% *Streptococcus* spp. (01/30), 6,6% *Streptococcus agalactiae* (02/30), 6,6% *Corynebacterium bovis* (02/30), 3,3% *Enterococcus* spp. (01/30), 3,3% *Bacillus* spp. (01/30), 6,6% *Bacillus cereus* (02/30), 3,3% *Listeria* spp. (01/30), and 3,3% *Nocardia* spp. (01/30). The resistance profile was determined by the disk diffusion method in enriched Mueller Hinton agar; and it was observed that *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. showed a higher resistance profile to the tested antimicrobials. Given the results of isolation, associated with the shortage of studies on *B. cereus* mastitis isolates, this study continued with these isolates, to which it was determined the virulence profile by PCR through the amplification of hemolysin genes (*hblA*, *hblC*, *hblD*), cytotoxin K, cereulide, pleiotropic regulator and non-hemolytic enterotoxin. The minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal concentration, and the biofilm production were evaluated by optical density, and the interactions between bioactive substances and antimicrobials by the Checkerboard test. Both isolates of *B. cereus* (1 e 2) harbored virulence genes for hemolysin (*hblA*, *hblC*, *hblD*) in addition to cytotoxin K, cereulide, and pleiotropic regulator. The minimum inhibitory concentration (MIC), and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the bioactive compound 7-epiclusianone on the two *B. cereus* isolates was of 1,95 µg/mL for *B. cereus* 1, and 3,9 µg/mL for *B. cereus* 2. The MIC of the guttiferone-A for *B. cereus* 1 and 2 consisted of 7,81 µg/mL and 15,62 µg/mL respectively, also presenting bactericidal activity. In the interaction tests between antimicrobials and bioactive compounds, the 7-epiclusianone and the guttiferone-A exhibited significant synergism when associated with β-Lactams such as ampicillin and amoxicillin, presenting antimicrobial activity to both *B. cereus* isolates. It was also shown the potential to reduce the effective concentration of these conventional antimicrobials, also providing for the reduction of the biofilm production by the association of ampicillin and guttiferone-A. The results presented in this work emphasize the importance of isolating, indentifying, and caracterizing the mastitis causative agents, even the less frequent, such as *B. cereus*, for their association with human, animal, and environmental health problems. In addition, the aforementioned results point to promising alternatives for treatment of bovine mastitis, which will contribute to the reduction of the bacterial resistance to antimicrobials as well as disease relapses in the herd.

Keywords: *B. cereus*. Phytotherapics. Dairy Cattle. Antimicrobial resistance. Synergy.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura química das substâncias bioativas..... | 17 |
| Figura 2 - Perfil de resistência de bactérias isoladas de mastite bovina nos municípios de Cáceres, Araputanga e Campo Verde, no estado de Mato Grosso..... | 43 |
| Figura 3 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 1 com associação de ampicilina e gutiferona-A..... | 71 |
| Figura 4 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 1 com associação de amoxicilina e gutiferona-A..... | 71 |
| Figura 5 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 1 na presença de 7-epiclusianona..... | 72 |
| Figura 6 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 1 com associação de ampicilina e 7-epiclusianona..... | 72 |
| Figura 7 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 1 com associação de amoxicilina e 7-epiclusianona..... | 73 |
| Figura 8 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 1 com associação de ceftiofur e 7-epiclusianona..... | 73 |
| Figura 9 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 1 na presença de gutiferona-A..... | 74 |
| Figura 10 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 2 com associação de ampicilina e gutiferona-A..... | 74 |
| Figura 11 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 2 com associação de amoxicilina e gutiferona-A..... | 75 |
| Figura 12 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 2 na presença de gutiferona-A..... | 76 |
| Figura 13 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 2 com associação de ampicilina e 7-epiclusianona..... | 76 |
| Figura 14 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 2 com associação de amoxicilina e 7-epiclusianona..... | 77 |
| Figura 15 - Avaliação da formação de biofilme por <i>B. cereus</i> 2 na presença de 7-epiclusianona..... | 77 |
| Figura 16 - Multiplicação de <i>B. cereus</i> 1 e <i>B. cereus</i> 2 isolados de mastite bovina submetidas a diferentes concentrações de Gutiferona-A por 24 horas. C+ = Controle de crescimento (100µL de cultura bacteriana + 100µL de BHI); C- = Controle de esterilidade (200µL de BHI)..... | 86 |
| Figura 17 - Multiplicação de <i>B. cereus</i> 1 e <i>B. cereus</i> 2 isolados de mastite bovina submetidas a diferentes concentrações de 7-epiclusianona por 24 horas. C+ = Controle de crescimento (100µL de cultura bacteriana + 100µL de BHI); C - = Controle de esterilidade (200 µL de BHI). | 86 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Primers e reações para a confirmação de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite com mastite bovina em propriedades no interior do estado de Mato Grosso..... | 36 |
| Tabela 2 - Ocorrência de mastite bovina em três propriedades do interior do estado de Mato Grosso..... | 38 |
| Tabela 3 - Frequência dos isolados bacterianos identificados de mastite em rebanhos de bovinos leiteiros dos municípios de Cáceres, Araputanga e Campo Verde, estado de Mato Grosso. | 40 |
| Tabela 4 - Confirmação de isolados de <i>Bacillus</i> spp. de acordo com banco de dados do sistema SHERLOCK® e a biblioteca RTSBA6 6,21..... | 42 |
| Tabela 5 - Primers e reações para detecção de genes de virulência de <i>Bacillus cereus</i> isolados de mastite bovina. | 60 |
| Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite frente a isolados de <i>Bacillus cereus</i> | 65 |
| Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de substâncias extraídas de plantas frente <i>Bacillus cereus</i> isolados de mastite bovina. | 66 |
| Tabela 8 - Médias das absorvâncias (D.O), obtidas por testes realizados em triplicatas, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A (gut-A) e 7-epiclusianona (7-epi) de <i>Bacillus cereus</i> 1 e 2 isolados de mastite bovina. | 67 |
| Tabela 9 - Interações de antimicrobianos com substâncias bioativas sob <i>Bacillus cereus</i> isolados de mastite bovina. | 68 |
| Tabela 10 - Médias de densidade óptica e classificação do potencial de formação de biofilme por isolados de <i>Bacillus cereus</i> obtidos de mastite bovina. | 70 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------|---|----|
| Quadro 1 - | Antibiograma realizado de isolados obtidos de propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso. | 51 |
| Quadro 2 - | Concentração Inibitória Mínima X Concentração do checkerboard – Antimicrobianos convencionais. | 87 |
| Quadro 3 - | Concentração Inibitória Mínima X Concentração do checkerboard – Substâncias Bioativas. | 88 |

LISTA DE ABREVIATÖES

| | |
|-------|---|
| µg | micrograma |
| 7-Epi | 7- epiclusianona |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CMT | California Mastitis Test |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DO | densidade ptica |
| EE | Extrato etanólico |
| FIC | ndice de concentração inibitória fracionária |
| Gut-A | Gutiferona-A |
| mg | miligrama |
| mL | mililitro |
| nm | nanmetro |
| OEs | leos essenciais |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RPM | Rotações por minuto |
| TSB | Tryptone Soya Broth |
| UFC | Unidade formadora de colnia |
| UFV | Universidade Federal de Viçosa |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| | REFERÊNCIAS | 19 |
| 2 | OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 23 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| 3 | CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA - MASTITE BOVINA: TRATAMENTO CONVENCIONAL E AÇÃO DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS..... | 24 |
| 4 | CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1 - OCORRÊNCIA DE MASTITE BOVINA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS NO ESTADO DE MATO GROSSO | 31 |
| | RESUMO | 32 |
| | ABSTRACT | 33 |
| 4.1 | INTRODUÇÃO..... | 34 |
| 4.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 4.2.1 | Diagnóstico e coleta de amostras | 35 |
| 4.2.2 | Isolamento e identificação | 36 |
| 4.2.3 | Perfil de resistência..... | 37 |
| 4.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 4.3.1 | Ocorrência de Mastite | 38 |
| 4.3.2 | Isolados obtidos | 39 |
| 4.3.3 | Perfil de resistência..... | 42 |
| 4.4 | CONCLUSÃO | 44 |
| | REFERÊNCIAS | 46 |
| | MATERIAL SUPLEMENTAR I..... | 51 |
| 5 | CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2 - POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM <i>BACILLUS CEREUS</i> ISOLADOS DE MASTITE BOVINA | 53 |
| | RESUMO | 54 |
| | ABSTRACT | 55 |
| 5.1 | INTRODUÇÃO..... | 56 |
| 5.2 | MATERIAL E MÉTODOS | 59 |
| 5.2.1 | Deteção de fatores de virulência | 59 |
| 5.2.2 | Preparo dos antimicrobianos | 60 |
| 5.2.3 | Preparo das substâncias bioativas..... | 61 |
| 5.2.4 | Concentração Inibitória Mínima – CIM..... | 61 |

| | | |
|-------|--|----|
| 5.2.5 | Concentração Bactericida Mínima – CBM | 62 |
| 5.2.6 | Interações entre antimicrobianos e substâncias bioativas | 62 |
| 5.2.7 | Produção de biofilmes | 62 |
| 5.3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 5.3.1 | Fatores de virulência | 64 |
| 5.3.2 | Determinação de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima | 65 |
| 5.3.3 | Interações entre antimicrobianos e substâncias bioativas | 68 |
| 5.3.4 | Produção de Biofilme por <i>Bacillus cereus</i> | 69 |
| 5.4 | CONCLUSÃO | 79 |
| | REFERÊNCIAS | 80 |
| | MATERIAL SUPLEMENTAR II | 86 |
| | MATERIAL SUPLEMENTAR III | 87 |
| 6 | CONCLUSÕES GERAIS | 89 |
| 7 | PERSPECTIVAS | 90 |
| | MATERIAL SUPLEMENTAR IV | 91 |

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FOOD..., 2019), o Brasil se encontra entre as primeiras posições no ranking mundial de produção de leite e de rebanho de vacas ordenhadas. Mesmo enfrentando um cenário de pandemia, em 2020 houve um avanço de 1,5% sobre os 34,9 bilhões de litros produzidos em 2019, atingindo a marca histórica de 35,4 bilhões de litros de leite em um único ano (INSTITUTO..., 2021).

Apesar do destaque na produção mundial de leite, quando se trata de produtividade animal (litros/vaca no ano), os números ficam aquém quando comparados a vários outros países (FOOD..., 2019).

A principal causa para a baixa eficiência na produtividade de leite está relacionada à mastite. Demeu *et al.* (2016), calcularam os custos da mastite em rebanhos leiteiros com produtividade média diária de 10, 20 e 30 litros de leite/dia, considerando a diminuição na produção e descarte de leite, somado aos custos de prevenção e tratamento da mastite; a variação dos custos com a mastite vaca/ano foi de R\$ 1.922,82 a R\$ 4.424,68.

A mastite bovina é caracterizada pela inflamação da glândula mamária, causada principalmente por infecção bacteriana; podendo resultar em destruição de células epiteliais e redução da capacidade produtiva do animal (TOZZETTI *et al.*, 2008). Os microrganismos causadores de mastite podem ser classificados em contagiosos e ambientais, sendo os contagiosos de maior incidência *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (LANGONI *et al.*, 2011). Entre as bactérias causadoras da mastite ambiental destacam-se *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., (SILVA *et al.*, 2010; LANGONI *et al.*, 2017); bem como *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (SOMMERHAUSER *et al.*, 2003; SCHUKKEN *et al.*, 2014).

Embora *Bacillus* spp. não seja um agente etiológico da mastite bovina mais comumente encontrado, estas bactérias atuam como agentes oportunistas; sendo, até o momento, *Bacillus cereus* a principal espécie documentada como causadora de mastite (BETTANIN *et al.*, 2019).

Apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, podemos observar falhas, relacionadas especialmente à resistência bacteriana, ocasionada, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, muitas

vezes por falta de informações relevantes, como formação de biofilmes e suscetibilidade dos microrganismos patogênicos frente aos antimicrobianos (CAZOTO *et al.*, 2011; GIRARDINI *et al.*, 2016). Analisar os resultados do monitoramento do perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados na propriedade, é uma alternativa para a obtenção de êxito no tratamento (RIBEIRO *et al.*, 2016).

O uso indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento da mastite pode resultar na seleção de patógenos multirresistentes, além de resíduos no leite e derivados, fomentando assim o risco à saúde pública (COSTA *et al.*, 2016).

A resposta insatisfatória à antibioticoterapia e o aumento de resistência bacteriana, sobretudo por *S. aureus*; tem sido foco de muitos estudos no esforço de determinar quais os fatores responsáveis por falhas na terapia, de modo que os tratamentos sejam mais efetivos (CORRÊA, 2018; FERNANDES, 2019; FANIN *et al.*, 2020).

Segundo Ganda *et al.* (2016), cerca de 80% dos antimicrobianos usados na indústria de laticínios são prescritos para tratar a mastite; portanto as mudanças no microbioma do leite (disbiose), são resultantes da mastite e da terapia antimicrobiana, causando impacto direto na saúde humana, além da saúde animal. Deve-se descartar o leite no período do tratamento, evitando assim resíduo do antimicrobiano no leite, (FERNANDES, 2019).

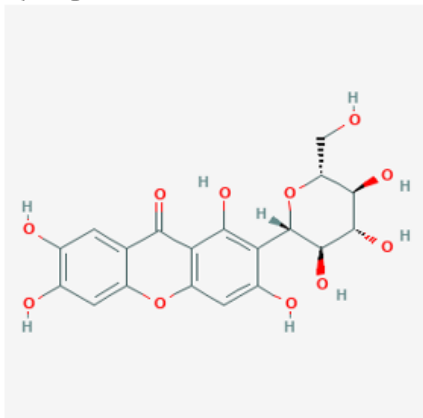
Nesse cenário, várias substâncias extraídas de plantas têm sido estudadas como alternativas terapêuticas (DAL POZZO *et al.*, 2011; MILLEZI *et al.*, 2014); tornando-se candidatas ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (MIRANDA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas usando várias partes de plantas (raiz, caule, folhas, flores e frutos) para avaliar suas atividades farmacológicas; gerando dados importantes e ótimos resultados; sobretudo para ações anti-inflamatórias, antineoplásica, anti-hipertensiva, antiarrítmica, analgésicas e antimicrobiana (CORRÊA, 2018; MAIA *et al.*, 2018).

Dentre as substâncias bioativas, que vêm sendo estudadas por apresentarem um potencial para tratamento de diversas doenças, podemos mencionar a mangiferina (Figura 1-A), principal constituinte da *Mangifera indica L.*, extraída da casca, frutos e folhas, da planta, a qual, possui ação anti-inflamatórias e atividades antiproliferativa, antioxidativa e anti-carcinogênica (ZHANG; YUE, 2016; PAN *et al.*, 2018); o beta-cariofileno (Figura 1-B), encontrado em óleos essenciais de várias espécies de

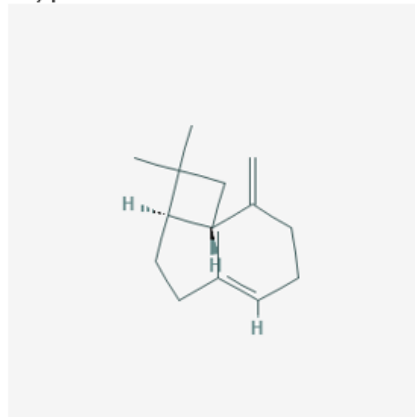
plantas, tais como, cravo (*Syzygium aromaticum*) e canela (*Cinnamomum* spp.), apresentando efeitos antioxidantes, anti-inflamatório, neuroprotetor, analgésico, antilipídêmicas, além de atividade antibacteriana (ALBERTI *et al.*, 2017; AGUILAR-ÁVILA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021). Existem também a gutiferona A (gut-A), e a 7-epiclucianona (7-epi) (Figura 1-C e D), que são extraídas da *Garcinia brasiliensis* (Bacupari), apresentando atividade leishmanicida e antimicrobiana, especialmente sobre bactérias Gram-positivas (SANTOS *et al.*, 1999; Maia *et al.*, 2018).

Figura 1 - Estrutura química das substâncias bioativas.

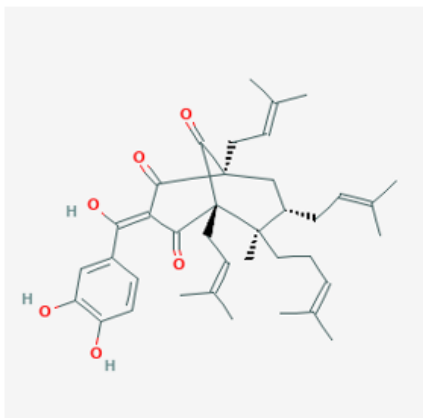
A) Mageferina



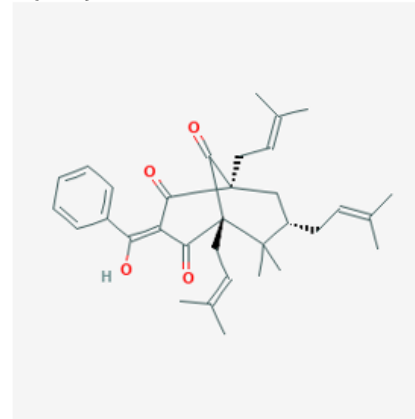
B) β -cariofileno



C) Gutiferona-A



D) 7-epiclucianona



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

A biodiversidade brasileira favorece estas pesquisas, trazendo benefícios para a sociedade e a própria ciência. As espécies do Cerrado, incluindo o Mato-grossense, apresentam uma grande diversidade, sendo assim, um bioma que deveria ser considerado área prioritária para pesquisas de plantas medicinais e conservação de recursos naturais.

Neste contexto, o presente trabalho visa estudar substâncias bioativas

extraídas de plantas, presentes também no bioma cerrado, associando-as aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina, buscando alternativas sustentáveis às terapias alopáticas. Com este foco evita-se efeitos nocivos para a saúde animal, humana e ao meio ambiente, contemplado a tríade da Saúde Única (*One Health*).

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-ÁVILA, D. S. et al. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, attenuates neuropathic pain and depressive-like behavior in experimental diabetic mice. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 5, p. 460-468, 2019.
- ALBERTI, T. B. et al. (-)- β -Caryophyllene, a CB2 receptor-selective phytocannabinoid, suppresses motor paralysis and neuroinflammation in a murine model of multiple sclerosis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 691, 2017.
- BARROS, M. et al. Antibacterial Activity of 7-Epiclusianone and Its Novel Copper Metal Complex on *Streptococcus* spp. Isolated from Bovine Mastitis and Their Cytotoxicity in MAC-T Cells. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 823, 2017.
- BETTANIN, J. et al. Frequência de Isolamentos dos Agentes Etiológicos da Mastite Bovina no Sudoeste Paranaense. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 13, n. 4, p. 440-451, 2019.
- CAZOTO, L. L. et al. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **The Journal of antibiotics**, v. 64, n. 5, p. 395-397, 2011.
- CORRÊA, C. S. S. **Nanoprópolis no tratamento da mastite subclínica bovina: avaliação *in vivo* da eficácia via intramamária durante o período de lactação**. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- COSTA NOEL, C. et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de "slime" de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina na região sul-fluminense. **Revista de Saúde**, v. 7, n. 1, p. 22-26, 2016.
- DAL POZZO, M. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, p. 667-672, 2011.
- DEMEU, F. et al. Efeito da produtividade diária de leite no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, n. 1, p. 53-61, 2016.
- FANIN, M. et al. Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 14, n. 1, p. 24-32, 2020.
- FERNANDES, F. C. **Avaliação do potencial antimicrobiano do decocto da folha do cajá (*Spondias mombin* L.) na prevenção da mastite bovina**. 2019. 61 F. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2019.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAO STAT - Livestock Primary**. Roma, Italy, 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>> Acesso em: 10 fev. 2022.

GANDA, E. K. et al. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

GIRARDINI, L. K. et al. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* clusters on small dairy farms in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 951-956, 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa Trimestral do Leite**. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 2021. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-doleite.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 10 fev. 2022.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1261-1269, 2017.

LANGONI, H. et al. Quality and microbiological aspects of bovine milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

MAIA, N. L. et al. Synergism of plant compound with traditional antimicrobials against *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1203, 2018.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 18-24, 2014.

MIRANDA, J. A. L. et al. Antibacterial activity of leaf extracts of *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 1142-1149, 2015.

PAN, J. et al. Bioactive phenolics from mango leaves (*Mangifera indica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 400-406, 2018.

RIBEIRO, M. G. et al. **Mastite em animais domésticos**: doenças infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 1155-1205.

SANTOS, E. L. et al. Enhanced antibacterial effect of antibiotics by the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and its major constituent beta-caryophyllene. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100100, 2021.

SANTOS, M. H. dos et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, p. 654-660, 1999.

SCHUKKEN, Y. et al. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 8, p. 5250-5264, 2014.

SILVA, M. V. M. et al. A mastite interferindo no padrão de qualidade do leite: uma preocupação necessária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.

3, n. 14, p. 1-10, 2010.

SOMMERHÄUSER, J. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary microbiology**, v. 96, n. 1, p. 91-102, 2003.

TOZZETTI, D. S. et al. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas—revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 6, n. 10, p. 1-7, 2008.

ZHANG, Q.; YUE, L. Inhibitory activity of mangiferin on *Helicobacter pylori* induced inflammation in human gastric carcinoma AGS cells. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 14, n. 1, p. 263–271, 23 nov. 2016.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano de substâncias bioativas extraídas de plantas existentes no cerrado e verificar as suas associações com antimicrobianos convencionais sobre bactérias isoladas de mastite bovina em rebanhos de propriedades leiteiras localizadas no estado de Mato Grosso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento e a identificação de bactérias a partir de amostras de leite de animais com mastite clínica e subclínica, em propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso;
- Identificar os perfis de resistência dos isolados aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite;
- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos antimicrobianos e das substâncias bioativas;
- Avaliar as associações/interações de antimicrobianos e substâncias bioativas: mangiferina, β -cariofileno, 7-epiclusianona, gutiferona-A;
- Investigar a indução ou inibição da formação de biofilmes frente às melhores associações (sinérgicas demonstradas pelo teste de checkerboard).

Esta tese está dividida em três capítulos:

CAPÍTULO 1 - Revisão de literatura

Mastite Bovina: Tratamento Convencional e Ação de Compostos Extraídos de Plantas

CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1

Ocorrência de mastite bovina em propriedades leiteiras no estado de Mato Grosso

CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2

Potencial antimicrobiano de substâncias bioativas em *Bacillus cereus* isolados de mastite bovina

3 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA - MASTITE BOVINA: TRATAMENTO CONVENCIONAL E AÇÃO DE COMPOSTOS EXTRAÍDOS DE PLANTAS

ALVES, Thâmela; MOREIRA, Maria Aparecida. Mastite bovina: tratamento convencional e ação de compostos extraídos de plantas. **Uniciências**, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2021

Mastite Bovina: Tratamento Convencional e Ação de Compostos Extraídos de Plantas

Bovine Mastitis: Conventional Treatment and Action of Compounds Extracted from Plants

Thâmela Alves^{*a}; Maria Aparecida Moreira^b

^aUniversidade de Cuiabá, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biociência Animal. MT, Brasil.

^bUniversidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Laboratório de Doenças Bacterianas. MG, Brasil.

*E-mail: thamcristin@hotmail.com

Resumo

A mastite bovina é a doença que mais onera a pecuária leiteira, por se tratar de uma doença pluri-etiológica e multifatorial, e altamente contagiosa. O uso de antimicrobianos ainda é a principal estratégia para controle e tratamento, todavia, a resposta à antibioticoterapia e o aumento de resistência bacteriana, bem como a presença de resíduos antimicrobianos no leite têm sido foco de estudos para definir quais os fatores responsáveis por falhas na terapia, além do estudo de várias substâncias extraídas de plantas como alternativas terapêuticas. Este artigo foi elaborado por meio de pesquisa bibliográfica, com o objetivo de abordar o uso de compostos naturais extraídos de plantas sobre bactérias isoladas em mastite bovina. Várias substâncias extraídas de plantas têm sido estudadas, para avaliação de suas atividades farmacológicas, gerando dados importantes e ótimos resultados. Grande destaque tem sido dado aos óleos essenciais, substâncias complexas, voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, oriundas do metabolismo secundário de vegetais e que têm despertado interesse como alternativa ao tratamento da mastite bovina. Diversos trabalhos têm comprovado a eficácia de compostos naturais extraídos de plantas sobre bactérias isoladas em mastite bovina, apresentando como estratégia terapêutica promissora, apesar de grande parte da diversidade genética vegetal do Brasil ainda permanecer oculta à ciência, merecendo a avaliação de suas propriedades farmacológicas.

Palavras-chave: Compostos Naturais. Pecuária Leiteira. Antimicrobiano.

Abstract

Bovine mastitis is the disease that burdens the most the dairy farming, due to the fact that it has many etiological reasons, and it is highly contagious. The use of antimicrobials is still the main strategy to control and treat this disease. However, the response to antibiotic treatment, the increase of bacterial resistance and the presence of antimicrobials residues in the milk as well, has been the main focus for researches to define which were the failure causes in the treatment, in addition to mentioning researches of many substances extracted from plants as alternative treatments. This article was written using bibliographic survey with the objective to discuss the use of natural compounds extracted from plants over cattle mastitis isolated bacteria. Many substances taken from plants have been studied for the proper evaluation of their pharmacological usage, resulting in the achievement of important data and great results. A considerable highlight has been given to the essential oils, complex, volatile, lipophilic, odoriferous and liquid substances originated from the plants secondary metabolism, and which have risen the interest as an alternative to the cattle mastitis treatment. Several researches have proved the efficiency of natural compounds extracted from plants over cattle mastitis isolated bacteria, proving to be a new promising therapeutic strategy, although most of the vegetal genetic diversity in Brazil is still hidden to science, thus deserving a proper evaluation of their pharmacological properties.

Keywords: Natural Compounds. Dairy Farming. Antimicrobial.

1 Introdução

A mastite bovina é a doença que mais onera a pecuária leiteira, por se tratar de uma doença pluri-etiológica e multifatorial (ACOSTA *et al.*, 2016; QUADROS *et al.*, 2019). Em grande parte dos casos, as causas estão associadas a agentes bacterianos, que invadem o canal do teto e se instalam nos tecidos mamários se multiplicando e, induzindo à inflamação (PERES NETO; ZAPPA, 2011). Entre os prejuízos estão a queda da produção leiteira, o descarte do animal por acometimento do parênquima mamário, descarte do leite de animais em tratamento e a redução da qualidade do leite, inviabilizando seu processamento (SANTOS; FONSECA, 2007; LANGONI *et al.*, 2011).

Na mastite contagiosa bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são as mais prevalentes, pois permanecem no interior da glândula mamária (PERES NETO; ZAPPA, 2011; KEEFE *et al.*, 2011; ACOSTA *et al.*, 2016). Também são agentes importantes as enterobactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Enterobacter* spp, (SILVA *et al.*, 2010; LANGONI *et al.*, 2017), bem como *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, considerados agentes causadores de mastites ambientais (SOMMERHAUSER *et al.*, 2003; SCHUKKEN *et al.*, 2014). A transmissão destes patógenos ocorre, especialmente, entre animais ou entre quartos mamários durante a ordenha (COSTA *et al.*, 2017; LANGONI *et al.*, 2011).

O uso de medicamentos antimicrobianos ainda é a

principal estratégia para tratamento da mastite, comumente são empregadas drogas como penicilinas, estreptomicina, cefalosporina e tetraciclina (BEURON, 2014). As cefalosporinas têm sido amplamente utilizadas no tratamento das mastites, independente do micro-organismo causador (LANGONI *et al.*, 2017). Porém, o principal entrave, além da resposta animal, em função do patógeno causal, é o resíduo do antimicrobiano no leite, devendo-se descartar o leite no período do tratamento (FERNANDES, 2019). A resposta insatisfatória à antibioticoterapia e o aumento de resistência bacteriana, sobretudo por *S. aureus*, tem sido foco de muitos estudos no esforço de determinar quais os fatores responsáveis por falhas na terapia, de modo que os tratamentos sejam mais efetivos no futuro (CORRÊA, 2018; FERNANDES, 2019; FANIN *et al.*, 2020).

Nesse cenário, várias substâncias extraídas de plantas têm sido estudadas como alternativas terapêuticas (POZZO *et al.*, 2011; MILLEZI *et al.*, 2014), tornando-se candidatas ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (MIRANDA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017). Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas usando várias partes de plantas (raiz, caule, folhas, flores e frutos) para avaliar suas atividades farmacológicas, gerando dados importantes e ótimos resultados, sobretudo, para ações anti-inflamatórias, antineoplásica, anti-hipertensiva, antiarrítmica, analgésicas e antimicrobiana (MAIA, 2016; CORRÊA, 2018).

Este artigo tem como objetivo apresentar alterações decorrentes da mastite bovina, avaliar ação de tratamentos convencionais e compostos naturais extraídos de plantas sobre bactérias isoladas em mastite bovina.

2 Desenvolvimento

2.1 Metodologia

Trata-se de uma pesquisa indireta, elaborada por meio de pesquisa bibliográfica, com a proposta de abordar novos estudos sobre a mastite bovina e substâncias utilizadas como alternativa para o tratamento desta infecção, amparada em referências teóricas publicadas, por meio de periódicos científicos em bases de dados como SciELO, Pubmed, Portal Periódicos Capes e Google Acadêmico, publicados entre os anos de 2003 a 2020. Após a acessibilidade do trabalho na íntegra, foram selecionados os estudos de maior relevância para a temática.

Desse modo, foram selecionados trinta e cinco estudos com texto completo disponível, publicados em território nacional e internacional, utilizando como palavras-chave: mastite; bactérias isoladas, substâncias extraídas de plantas; antimicrobianos, individualmente e cruzadas entre si.

2.2 A mastite bovina e suas repercussões na produção leiteira

A pecuária leiteira, no território brasileiro, representa um papel econômico de alta significância, haja vista que se

trata de um país com reconhecido potencial de exportação de leite para o mercado mundial, assim como exibindo um relevante papel no fornecimento de alimentos e na geração de empregos ao longo dessa cadeia produtiva (ZOCCAL *et al.*, 2008; MAIA, 2016). No entanto, a diversidade no padrão de produção e a alta prevalência de mastite nos rebanhos leiteiros ainda se configuram como fatores impeditivos para uma ascensão desenvolvimentista da atividade leiteira nacional (LEITE, 2016).

A produção leiteira brasileira não possui um padrão (MAIA, 2016), visto que é realizada tanto em pequenas propriedades com produção de subsistência, quanto nas grandes propriedades com produção de larga escala, nas quais do ponto de vista tecnológico, no primeiro caso, as técnicas de produção são subutilizadas ou até mesmo ausentes, enquanto no segundo caso são empregadas avançadas tecnologias, tendo em vista o aperfeiçoamento da produção, bem como assegurar a obtenção de um produto final sanitariamente controlado (ZOCCAL *et al.*, 2008; QUADROS *et al.*, 2019).

Entre os diversos fatores relacionados com a baixa produtividade leiteira se destacam as condições sanitárias dos rebanhos (SILVA *et al.*, 2010; LEITE, 2016), sendo justamente nessa questão que se enquadra a mastite bovina. A referida doença é um dos principais males que acometem a bovinocultura leiteira, definida como um processo inflamatório da glândula mamária, de origem infecciosa ou não, que atinge a mucosa, o tecido secretor e/ou intersticial da glândula mamária (SANTOS; TOMAZI; GONÇALVES, 2011; ACOSTA *et al.*, 2016; LANGONI *et al.*, 2017).

Na maior parte dos casos, as causas da mastite se encontram associadas à agentes bacterianos, os quais invadem a glândula mamária por meio do canal do teto e, então se instalam nos tecidos mamários, nos quais se multiplicam e, por consequência, induzem à inflamação (PERES NETO; ZAPPA, 2011; MAIA, 2016). O desencadeamento do processo inflamatório, na realidade, é a resposta gerada pelo sistema imune do animal, visando a eliminação do agente causador, neutralização das toxinas produzidas, e também a regeneração dos tecidos lesionados (SANTOS; FONSECA, 2007; KEEFE *et al.*, 2011).

Em razão do processo inflamatório há aumento da permeabilidade vascular, e os componentes do plasma sanguíneo são misturados ao leite, alterando seu equilíbrio iônico e outras propriedades sensoriais (SANTOS; TOMAZI; GONÇALVES, 2011; LEITE, 2016). Ademais, uma vez lesionados pela inflamação, a quantidade de alvéolos pode reduzir, havendo também redução da capacidade de secreção de leite, levando à diminuição leiteira entre 10% à 30% (PERES NETO; ZAPPA, 2011). A substituição das células epiteliais secretoras por tecido conjuntivo, pode ser uma das consequências da mastite, causando a perda da capacidade produtiva (SOMMERHAUSER *et al.*, 2003).

Por se tratar de uma doença plurietiológica e multifatorial,

a mastite é uma das principais responsáveis por causar perdas na indústria leiteira (ACOSTA *et al.*, 2016; QUADROS *et al.*, 2019). Entre os principais prejuízos acarretados pela doença estão a queda expressiva da produção leiteira, o descarte de vacas pelo acometimento do parênquima mamário, a desvalorização comercial das mesmas, bem como os custos referentes à necessidade de diagnósticos microbiológicos, medicamentos e médico veterinário (SANTOS; FONSECA, 2007; SILVA *et al.*, 2010; PERES NETO; ZAPPA, 2011).

Evidencia-se, ainda, os prejuízos ocasionados pelo descarte do leite dos animais em tratamento e a significativa diminuição da qualidade do leite em razão das alterações microbiológicas, físico-químicas e sensoriais, assim, inviabilizando o processamento do mesmo (SANTOS; FONSECA, 2007; MAIA, 2016). No que tange aos consumidores, a possível ingestão do leite proveniente de animais acometidos pela doença possibilita que determinados resíduos microbiológicos ou/e antimicrobianos possam ameaçar a saúde dos mesmos (SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2012; OLIVER *et al.*, 2020).

2.3 Manifestação, diagnóstico e agentes infecciosos

A mastite bovina pode ser classificada como clínica ou subclínica, de acordo com a sintomatologia dessa enfermidade. A mastite clínica é caracterizada pela visualização de sinais inflamatórios no leite e na vaca, a gravidade de sua manifestação pode ser classificada como leve, moderada e grave. O animal exibe alterações fisiológicas e também comportamentais, como tentativas de derrubar o conjunto de teteiras e menor tempo em decúbito, caracterizando desconforto e comprometimento do bem-estar (LEITE, 2016; LANGONI *et al.*, 2017).

A mastite subclínica, por sua vez, não apresenta sinais clínicos evidentes, porém é caracterizada pela redução da produção de leite, aumento da CCS (Contagem de Células Somáticas) e alteração da composição do leite. Há ainda o aumento da permeabilidade vascular e, por consequência, do influxo de células inflamatórias e da CCS (LANGONI *et al.*, 2011). Além disso, há alteração nos componentes do leite, elevando as concentrações de proteínas séricas, reduzindo os teores de caseína, lactose e gordura (SOMMERHAUSER *et al.*, 2003).

Cabe salientar que a mastite subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica, haja vista que pode ocorrer disseminação do agente infeccioso entre animais dentro dos rebanhos, sem qualquer observação de alterações macroscópicas do leite ou do úbere (ACOSTA *et al.*, 2016; LANGONI *et al.*, 2017). Estudos epidemiológicos estimam que a mastite subclínica seja responsável por 90-95% dos episódios da doença nos rebanhos, sendo 15 a 40 vezes mais prevalente que a clínica, embora sua prevalência seja subestimada, pois não exibe sintomas evidentes (SANTOS; FONSECA, 2007; COSTA *et al.*, 2017).

Para diagnóstico da mastite clínica pode ser utilizado o método da caneca de fundo escuro, realizado pela inspeção

dos três primeiros jatos de leite, contra um fundo preto. São indicativos de mastite: leite com grumos, mudança na coloração do leite, consistência mais aguada e, às vezes, presença de sangue ou pus. Este método é prático, e pode ser realizado com frequência, permitindo rápida identificação de animais acometidos (LEITE, 2016).

Na mastite subclínica, a detecção a campo, geralmente, é realizada por meio do teste rápido *California Mastitis Test* (CMT), identificando o processo inflamatório da glândula mamária pelo aumento de células somáticas (especialmente neutrófilos polimorfonucleares). Durante o teste, a liberação do material nuclear dos leucócitos leva ao aumento da viscosidade, caracterizando uma reação cuja interpretação depende da intensidade, podendo ser interpretada em termos de escores: negativo, suspeito, fracamente positivo, positivo e fortemente positivo, de 1 a 5, respectivamente (TRONCO, 2010).

A higiene inadequada das mãos do ordenhador e do ambiente está relacionado à mastite subclínica, principalmente, causada por *Staphylococcus* coagulase negativo, enfatizando importância das boas práticas na prevenção da mastite (LANGE, 2017). Ainda podem ser citadas as bactérias do gênero *Nocardia*, como outros patógenos ambientais, entre essas a *Nocardia asteroides*, altamente contagiosa, ocasionando episódios isolados de mastite, ou até em forma de surtos (LANGONI *et al.*, 2017). Neste grupo também se encontram as *Pseudomonas aeruginosa*, fungos, leveduras e algas do gênero *Prototheca* (PERES NETO; ZAPPA, 2011; SCHUKKEN *et al.*, 2014), os quais são de difícil tratamento, levando a casos crônicos que, na maioria das vezes, acarretam a perda dos tetos afetados.

Embora sejam classificados como patógenos ambientais, algumas cepas de *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, podem se comportar como contagiosas (KEEFE *et al.*, 2011). Estudos descrevem que todas as espécies bacterianas causadoras de mastite podem apresentar transmissão contagiosa ou ambiental (SCHUKKEN *et al.*, 2014).

2.4 Tratamento convencional e substâncias extraídas de plantas como tratamento alternativo

Os antimicrobianos são amplamente empregados para o tratamento de doenças infecciosas em animais e humanos, desde a década de 1940 com a introdução da penicilina. Ao longo dos anos, estudos relatam a resistência à antimicrobianos de agentes etiológicos causadores da mastite bovina (BARLOW, 2011; LEITE, 2016).

Essa resistência tem gerado infecções que não respondem às terapias convencionais. Em humanos, há relação com os antimicrobianos usados em animais de produção, pois certas bactérias resistentes podem ser transferidas ao humano pelo consumo, ou por resíduos de antimicrobianos na carne e leite, e seus derivados (OLIVER *et al.*, 2020).

Em rebanhos nos quais houve o uso sistêmico de

macrolídeos, cefalosporinas de terceira geração e tetraciclina, foi evidenciado o aumento da prevalência dos genes de resistência *erm*, *bla_{ARL}* e *tet*. A presença desses genes de resistência aos referidos antimicrobianos é preocupante, pois são antimicrobianos usados no tratamento de humanos e de animais, o que enfatiza a necessidade de reduzir o uso dessas drogas (NOBREGA *et al.*, 2018).

No Brasil, o cenário é mais grave, pois 25% do leite produzido não é industrializado em instalações de fiscalização oficial, e consumido sem tratamento térmico ou controle laboratorial (CORRÊA, 2018).

Nesse cenário, várias alternativas terapêuticas baseadas em substâncias extraídas de plantas têm sido estudadas como compostos bioativos (POZZO *et al.*, 2011; MILLEZI *et al.*, 2014); capazes de inibir o crescimento de patógenos ou matá-los, com toxicidade mínima às células hospedeiras (FERNANDES, 2019); inclusive tornando-se candidatos ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (MIRANDA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017).

O Brasil possui uma vasta biodiversidade vegetal, porém grande parte ainda permanece oculta à Ciência. Nas últimas décadas, foram iniciadas inúmeras pesquisas usando plantas para avaliar suas atividades farmacológicas, gerando dados importantes e ótimos resultados, sobretudo, para ações anti-inflamatórias, antineoplásica, anti-hipertensiva, antiarrítmica, analgésicas e antimicrobiana (MAIA, 2016; CORREA, 2018). As principais substâncias extraídas de plantas, com propriedades antimicrobianas incluem: polipeptídeos, terpenoides, alcaloides, substâncias fenólicas e polifenóis (fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonoides), taninos e cumarinas, em concentrações distintas, em que um composto farmacologicamente ativo é majoritário (POZZO *et al.*, 2011; ROCHA, 2019; FANIN *et al.*, 2020). Os óleos essenciais (OEs) extraídos de plantas condimentares e medicinais são um grupo de compostos bioativos, que têm despertado grande interesse como alternativa ao tratamento da mastite bovina associada à antimicrobianos (CASTRO *et al.*, 2016). Os OE são substâncias complexas, voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, oriundas do metabolismo secundário de vegetais. São aplicados em vários segmentos, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra o ataque de herbívoros, e nos setores de higiene pessoal, perfumaria, cosmética (POZZO *et al.*, 2011; MILLEZI *et al.*, 2014).

As plantas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae) são conhecidas por suas atividades anti-hipertensivas, anti-inflamatórias, antimaláricas, antimicrobianas, antiespasmódicas, antiulcerogênicas, antivirais e mio-relaxantes comprovadas. Os óleos essenciais de *Croton tetradenius* Baill (OECT) e *Croton pulegioidorus* Baill (OECF) apresentaram sinergismo entre si e com antimicrobianos convencionais (oxacilina, ampicilina e benzilpenicilina) sobre isolados de *S. aureus* e esta ação antibacteriana pode ser uma alternativa natural para terapia também combinados

com antimicrobianos (SALATINO, 2007; ROCHA, 2019). O OE extraído das folhas de *Satureja montana* e *Citrus limonia* apresenta efeito inibitório sobre *E. coli* e *S. aureus* respectivamente, e esta ação antibacteriana *in vitro* sugere o uso potencial destes óleos como uma alternativa aos antimicrobianos sintéticos (MILLEZI *et al.*, 2014).

O óleo de capim – limão (*Cymbopogon citratus*) apresenta ação antimicrobiana contra patógenos encontrados na mastite bovina como *S. agalactiae* e *B. cereus*, sendo que *S. aureus* e *E. coli* são sensíveis a alguns dos seus componentes como citral e geraniol, além de inibir a formação e atuar na eliminação de biofilmes de *S. aureus* (AIEMSAARD *et al.*, 2011).

O extrato etanólico (EE) das folhas de *Montrichadia linifera* (arruda) é um composto bioativo, com ação antibacteriana em bactérias Gram positivas (MIRANDA *et al.*, 2015). A atividade antibacteriana *in vitro* é demonstrada por extratos etanólicos obtidos de *Cymbopogon nardus*, *Senna macranthera*, *Artemisia absinthium*, *Baccharis dracunculifolia*, estes são capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* isolados de mastite bovina (DIAZ *et al.*, 2010). Óleos de plantas condimentares como *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Lippia graveolens* (lipia), *Zingiber officinale* (gengibre), *Salvia officinalis* (sálvia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Ocimum basilicum* (manjeriço) possuem efeitos em isolados de *Staphylococcus* spp, oriundos de rebanhos leiteiros bovinos (POZZO *et al.*, 2011; FANIN *et al.*, 2020).

Alpinia zerumbet, assim como diversas espécies medicinais, é rica em flavonoides que possuem atividade antimicrobiana, assim como o ácido elágico. O óleo essencial e o extrato etanólico das folhas de *A. zerumbet* exibem importante ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, sendo, portanto, candidato a compostos antibacterianos para tratamento da mastite bovina (CASTRO *et al.*, 2016).

Substâncias bioativas como 7-epiclusanona e seu complexo metálico 7-epiclusanona-cobre (7-epi-Cu), e gutiferona-A vêm mostrando como uma alternativa promissora para tratamento da mastite bacteriana, possuindo atividade antimicrobiana significativa sobre *Streptococcus* spp., *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina, além da segurança por não apresentarem efeitos citotóxicos sobre células da glândula mamária de bovinos (MAC-T) (MAIA, 2016; BARROS *et al.*, 2017).

3 Conclusão

Diversos trabalhos têm comprovado a eficácia de compostos extraídos de plantas sobre bactérias isoladas em mastite bovina, apresentando como estratégia terapêutica promissora para tratamento de infecções, reduzindo o uso de antimicrobianos tradicionais e se adequando à abordagem de Saúde Única. O Brasil, além de possuir a maior biodiversidade do Mundo, representa a maior diversidade genética vegetal e, grande parte ainda permanece oculta à Ciência, merecendo a avaliação de suas propriedades farmacológicas.

Referências

- ACOSTA, A. C. *et al.* Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016. doi: 10.1590/S0100-736X2016000700001.
- AIEMSAARD, J. *et al.* The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res Vet Sci.*, v. 91, p.31-37, 2011. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.01.012.
- BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*, v. 16, n. 4, p.383-407, 2011. doi: 10.1007/s10911-011-9235-z.
- BARROS, M. *et al.* Antibacterial Activity of 7-Epichlusanone and Its Novel Copper Metal Complex on *Streptococcus* spp. Isolated from Bovine Mastitis and Their Cytotoxicity in MAC-T Cells. *Molecules*, v. 22, n. 823; p. 1-15, 2017. doi: 10.3390/molecules22050823.
- BEURON, D. C. *et al.* Fatores de risco associados à resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 34, n.10, p.947-952, 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2014001000004.
- CASTRO, K. N. C. *et al.* Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. *Arq. Inst. Biol.*, v.83, p. 1-7, e0192014, 2016. doi: 10.1590/1808-1657000192014.
- CORRÊA, C. S. S. Nanoprópolis no tratamento da mastite subclínica bovina: avaliação *in vivo* da eficácia via intramamária durante o período de lactação. 2018, 90p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- COSTA, H. N. *et al.* Estimativa das perdas de produção leiteira em vacas mestiças Holandês x Zebu com mastite subclínica baseada em duas metodologias de análise. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 69, p.579-586, 2017. doi: 10.1590/1678-4162-9019.
- DIAZ, M. A. N. *et al.* Triagem de plantas medicinais para atividades antibacterianas em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 20, n. 5, p. 724-728, 2010 doi: 10.1590/S0102-695X2010005000013.
- FANIN, M. *et al.* Métodos alternativos no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. *Med. Vet.*, v.14, n.1, p.24-32, 2020. doi: 10.26605/medvet-v14n1-3711
- FERNANDES, F. C. Avaliação do potencial antimicrobiano do decocto da folha do cajá (*Spondias mombin* L.) na prevenção da mastite bovina. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2009..
- KEEFE, G. *et al.* Using on-farm mastitis culturing. *WCDS – Advances in Dairy Technology*, n.23, p.81-91, 2011.
- KÖCHE, J. C. Fundamentos de metodologia científica: teoria da ciência e iniciação à pesquisa. Petrópolis: Vozes, 2013.
- LANGE, M. J. *et al.* Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.*, v.37, n.11, p.1205-1212, 2017. doi: 10.1590/s0100-736x2017001100004.
- LANGONI, H. *et al.* Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesq. Vet. Bras.*, v.31, n.12, p.1059-1065, 2011. doi: 10.1590/S0100-736X2011001200004.
- LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesq. Vet. Bras.*, v.37, n.1, p.1261-1269, 2017. doi: 10.1590/s0100-736x2017001100011.
- LEITE, R. F. Concentração inibitória mínima de extratos brutos produzidos por actinobactérias para agentes causadores de mastite bovina. Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2016.
- MAIA, N. L. Potencial antimicrobiano de substâncias extraídas do fruto de *Garcinia brasiliensis* sobre isolados de *Streptococcus* spp. obtidos de mastite. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2016.
- MIRANDA, J. A. *et al.* Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.17, n.4, p.1142-1149, 2015. doi: 10.1590/1983-084X/14_169.
- MILLEZI, A. *et al.* Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.16, n.1, p.18-24, 2014. doi: 10.1590/S1516-05722014000100003.
- NOBREGA, D. B., DE BUCK, J., BARKEMA, H. W. Antimicrobial resistance in nonaureus *staphylococci* isolated from milk is associated with systemic but not intramammary administration of antimicrobials in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.101, ed. 8, p.7425-7436, 2018. doi: 10.3168/jds.2018-14540.
- OLIVER, J. P. *et al.* Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *J. Dairy Sci.*, v. 103, n. 2, 2020. doi: 10.3168/jds.2019-16778
- PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. *Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.*, v.16, p.1679-7353, 2011.
- POZZO, M. D. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. *Ciênc. Rural*, v.41, n.4, p.667-672, 2011. doi: 10.1590/S0103-84782011005000029.
- QUADROS, D. G. *et al.* Maior nível tecnológico e escala de produção propiciam melhor qualidade do leite e menor ocorrência de mastite bovina? *Rev. Acad.: Ciênc. Animal*, v.17, p.1-13, 2019. doi: 10.7213/1981-4178.2019.1700.
- ROCHA, R. R. Estudo comparativo sobre a composição química, atividade microbiana e efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Croton tetradenius* Baill. e *C. pulgiodorus* Baill., contra isolados de *Staphylococcus aureus*. Sobral: Universidade Federal do Ceará, 2019.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Usos tradicionais, química e farmacologia de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v.18, n.1, p.11-33, 2007. doi: 10.1590/S0103-50532007000100002.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007.
- SANTOS, M.V.; TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L. Novas estratégias para o tratamento da mastite bovina. *Rev. de Vet. e Zootec.*, v. 18, p. 131-137, 2011.
- SCHUKKEN, Y. *et al.* Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J. Dairy Sci.*, v. 97, n. 8, p. 5250-5264, 2014. doi: 10.3168/jds.2014-8008.
- SILVA, M. V. M. *et al.* A mastite interferindo no padrão de qualidade do leite: uma preocupação necessária. *Rev. Cient. Elet. de Med. Vet.*, Garça, ano 8, n. 14, p. 1-10, 2010.
- SILVA, R.M.; SILVA, R.C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de antibióticos em leite. *SaBios: Rev. Saúde Biol.*, v. 7, n.1, p.30-44, 2012.

SOMMERHÄUSER, J. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control program. *Vet. Microbiol.*, v. 96, n. 1, p. 91- 102, 2003. doi: 10.1016/s0378-1135(03)00204-9.

TRONCO, V.M. Manual para inspeção da qualidade do leite.

Santa Maria: UFSM, 2010.

ZOCAL, R. Anova pecuária leiteira brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE. 2008, Recife, Anais.... Rede Brasileira de Qualidade do Leite, 2008.

**4 CAPÍTULO 2 - ARTIGO 1 - OCORRÊNCIA DE MASTITE BOVINA EM
PROPRIEDADES LEITEIRAS NO ESTADO DE MATO GROSSO**

Ocorrência de mastite bovina em propriedades leiteiras no estado de Mato Grosso

RESUMO

ALVES, T. C. S. **Ocorrência de mastite bovina em propriedades leiteiras no estado de Mato Grosso**. Tese (Doutorado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2022.

A presença de mastite nos rebanhos leiteiros em todo o mundo, é responsável por grandes impactos, com custos elevados para o produtor e indústria de laticínios. Isolados provenientes de rebanhos leiteiros, que apresentam ampla resistência a antimicrobianos chamam a atenção por se tratar também de um problema de saúde pública. Este estudo verificou a ocorrência de mastite, o agente etiológico e o perfil de resistência aos antimicrobianos em propriedades do interior do estado de Mato Grosso. Foram examinados 154 bovinos leiteiros de três propriedades, localizadas nos municípios de Cáceres, Araputanga e Campo Verde. Do total de bovinos analisados, 20,12% (31/154) apresentaram mastite, obtendo 30 isolados bacterianos. Estes foram identificados por características morfotintoriais, bioquímicas, polymerase chain reaction (PCR) e pelo Sistema de Identificação Microbiana – Sherlock®. Classificou-se os isolados como sendo 43,3% *Staphylococcus* spp. (13/30), 20% (06/30) confirmados como *Staphylococcus aureus*, seguidos por 3,3% *Streptococcus* spp. (01/30), 6,6% *Streptococcus agalactiae* (02/30), 6,6% *Corynebacterium bovis* (02/30), 3,3% *Enterococcus* spp. (01/30), 3,3 % *Bacillus* spp. (01/30), 6,6% *Bacillus cereus* (02/30), 3,3% *Listeria* spp. (01/30) e 3,3% *Nocardia* spp. (1/30). O perfil de resistência foi determinado pelo método de difusão em placas de ágar *Mueller Hinton*, observando que a maioria dos isolados apresentavam um perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos testados (β - lactâmicos, aminoglicosídeo, fluoroquinolona, sulfonamida) . *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. foram os gêneros que apresentaram maior perfil de resistência frente aos antimicrobianos testados. *S. aureus* é um dos principais agentes etiológicos da mastite, entretanto, *B. cereus* foi MDR, apresentando maior perfil de resistência, mesmo sendo uma bactéria pouco isolada em leite mastítico. Evidencia-se a importância do isolamento e a identificação da bactéria, como também a realização de antibiograma para estabelecimento de um tratamento adequado, evitando a resistência aos antimicrobianos, recidivas da doença, e consequentemente diminuindo os custos decorrentes da mastite e aumentando os benefícios à saúde pública.

Palavras-chave: Leite. Microrganismos. Pressão Seletiva. Resistência.

ABSTRACT

ALVES, T. C. S. **Occurrence of bovine mastitis in dairy farms in the state of Mato Grosso.** Thesis (Animal Bioscience Doctorate) – University of Cuiabá, Cuiabá, 2022

The presence of mastitis in dairy herds in the whole world is responsible for major impacts, having high costs for the producer and the dairy industry. Dairy cattle isolates, which present high resistance to antimicrobials, are significant since they are also a public health problem. This study verified the occurrence of mastitis, the etiologic agent, and the antimicrobial resistance profile in country properties in Mato Grosso. It was examined a total of 154 animals in three properties located in the counties of Cáceres, Araputanga, and Campo Verde. From the total of cattle examined, 20,12% (31/154) presented mastitis, obtaining 30 bacterial isolates. Such were identified by morphotinctorial and biochemical characteristics, polymerase chain reaction (PCR), and the Sherlock™ Microbial Identification System. The isolates were classified as being 43,3% *Staphylococcus* spp. (13/30), 20% (06/30) were confirmed as *Staphylococcus aureus*, followed by 3,3% *Streptococcus* spp. (01/30), 6,6% *Streptococcus agalactiae* (02/30), 6,6% *Corynebacterium bovis* (02/30), 3,3% *Enterococcus* spp. (01/30), 3,3% *Bacillus* spp. (01/30), 6,6% *Bacillus cereus* (02/30), 3,3% *Listeria* spp. (01/30), and 3,3% *Nocardia* spp. (01/30). The resistance profile was determined by the disk diffusion method in enriched Mueller Hinton agar, and it was observed that the majority of the isolates presented a sensitivity profile against the antimicrobials tested (β - lactams, aminoglycosides, fluoroquinolone, sulfonamide). *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp. were the genus that presented higher resistance profile to the tested antimicrobials. *S. aureus* is one of the main etiological agents of mastitis; however, *B. cereus* was MDR, showing higher resistance profile, despite being a less isolated bacteria in mastitic milk.

It is made evident the importance of bacterial isolation and identification, as well as of an antibiogram in order to establish the appropriate treatment, avoiding the antimicrobial resistance, diseases relapses, and consequently reducing the mastitis costs and enhancing the benefits to public health.

Keywords: Milk. Microorganisms. Selective Pressure. Resistance.

4.1 INTRODUÇÃO

O estado de Mato Grosso é reconhecido nacionalmente pela pecuária de corte. Segundo o Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso – Indea/MT, o estado já atinge 32, 7 milhões de cabeças, liderando o número de cabeça de bovinos no Brasil (INSTITUTO..., 2022); em relação à pecuária leiteira, o estado do Mato Grosso ocupa o décimo primeiro lugar entre os maiores produtores de leite do país e almeja uma posição de maior destaque. Atualmente verifica-se que as propriedades de agricultura familiar exercem a atividade leiteira, sendo responsável pela maior parte da produção de leite no estado (BRASIL, 2019a).

A presença da mastite nos rebanhos brasileiros causa grandes impactos na qualidade e quantidade do leite, resultando em produtos com qualidade insatisfatória (BRASIL, 2019b).

Trabalhos realizados em outras regiões do Brasil, como mesorregiões leiteiras de Minas Gerais apresentam alta prevalência de mastite bovina e isolados com ampla resistência a antimicrobianos (TEIXEIRA *et al.*, 2014). Porém poucos trabalhos, como o de Almeida *et al.* (2022), apresentam estas informações sobre propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso.

Segundo Mcdougall (2016) e Farrel (2021), decisões quanto ao uso de antimicrobianos nas propriedades, na maioria das vezes, não são embasadas na sensibilidade dos isolados, reduzindo assim, as chances de sucesso do tratamento. Além de exercer uma maior pressão seletiva e conseqüentemente o aparecimento de bactérias resistentes e multirresistentes, causando prejuízos à saúde animal e humana.

Alterações genéticas em bactérias ocorrem rapidamente, não apenas em resposta à seleção por antibióticos, mas também a contaminação do meio ambiente pelo homem. As bactérias podem se tornar resistentes aos antimicrobianos através de mutação no DNA nativo e/ou pela transferência horizontal de genes (HGT), onde elementos móveis como plasmídeos realizam trocas de genes de resistência entre as bactérias (DAVIES, 2010).

Nesse contexto, maior conhecimento sobre os perfis das propriedades e dos rebanhos na região Mato-grossense, facilitaria a seleção de estratégias que visem melhorar a produção e minimizaria as chances de transmissão dos agentes e recidivas da doença, possibilitando a maior representatividade das propriedades leiteiras no

mercado, auxiliando e fomentando a cadeia do leite no estado de Mato Grosso.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência da mastite, sua etiologia e o perfil de resistência frente aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite em propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Diagnóstico e coleta de amostras

Foram selecionadas três propriedades de rebanhos bovino com aptidão leiteira, localizadas em três municípios do estado de Mato Grosso, sendo eles: Cáceres (mesorregião Centro-Sul do estado e na microrregião do Alto Pantanal – Latitude: 16° 4' 1" Sul, Longitude: 57° 41' 12" Oeste); Araputanga, (mesorregião do Sudoeste Mato-Grossense e na microrregião de Jauru – Latitude: 15° 28' 3" Sul, Longitude: 58° 21' 22" Oeste) e Campo Verde (mesorregião do Sudeste Mato-Grossense e na microrregião de Primavera do Leste – Latitude: 15° 32' 44" Sul, Longitude: 55° 9' 59" Oeste) (CIDADE..., 2021). Os animais das propriedades localizadas em Cáceres e Araputanga eram da raça girolando 3/4 e 5/8, os de Campo Verde, da raça holandesa.

Todos os animais foram examinados para a mastite. Para o diagnóstico da mastite clínica ou subclínica utilizou-se o exame físico e o *California Mastitis Test* (CMT), respectivamente. Um total de 31 animais foram diagnosticados com mastite, onde foi realizado a coleta de uma amostra de aproximadamente 10mL de leite de cada teto acometido, em frascos estéreis. Para coleta das amostras foi realizada a antissepsia dos tetos com álcool a 70% e descartados os três primeiros jatos de leite. Os frascos contendo amostras de cada teto acometido por mastite foram devidamente identificados e acondicionados em caixa isotérmica com gelo e encaminhados ao laboratório de microbiologia do Hospital Veterinário da Universidade de Cuiabá (UNIC), onde as amostras foram imediatamente armazenadas sob refrigeração e processadas em até 24 horas após a coleta.

4.2.2 Isolamento e identificação

Foi inoculado 50µL de leite em placas de Petri contendo ágar sangue de carneiro a 5% utilizando a técnica do espalhamento em superfície, em seguida essas placas foram incubadas em aerobiose a 37°C. A leitura das placas foi realizada após 48h.

Os isolados foram identificados fenotipicamente por meio de características morfológicas (tamanho, cor, odor e formato das colônias), tintoriais (coloração de Gram) e bioquímicas pertinentes a cada gênero (QUINN *et al.*, 2005).

Para auxiliar e confirmar a identificação de gêneros e espécies bacterianas, foi realizado o repique dos isolados em ágar cromogênico geral Accumat®, para identificação de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

A confirmação de *S. aureus* foi realizada por *polymerase chain reaction* (PCR), a partir da amplificação do gene *nuc*, codificador da nuclease termoestável e do gene *femA*, *Factor Essential for Methicillin Resistance*, conforme protocolo estabelecido por Yang *et al.* (2007) e Dias (2011) (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers e reações para a confirmação de *Staphylococcus aureus* isolados de leite com mastite bovina em propriedades no interior do estado de Mato Grosso.

| Genes | Primers no sentido 5'-3' | Ciclos | Produto (pb) | Referências |
|-------------|--------------------------|---|--------------|------------------------------|
| <i>nuc</i> | GCGATTGATGGTGATACGGTT | 94°C/1min, 32 ciclos: | 279 | Yang <i>et al.</i> (2007) |
| | AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC | 94°C/30s, 52°C/30s e 72°C/1,5min | | |
| <i>femA</i> | AAAAAAGCACATAACAAGCG | 94°C/5 min, 40 | 132 | Dias (2011) |
| | GATAAAGAAGAAACCAGCAG | ciclos:94°C/30s, 57°C/30s e 72°C/30s 72°C/4 min | | |

Para a extração de DNA, utilizou-se o kit comercial Bio Gene Extração de gDNA (Quibasa®) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de PCR foi preparada com um volume total de 25µL, utilizando *S. aureus* ATCC 25923 como controle positivo da reação e H₂O free como controle negativo.

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com GelRed®. Como padrão foi utilizado marcador de DNA de 100pb.

A confirmação do gênero e a identificação quanto à espécie dos isolados de

Bacillus spp. foi realizada por cromatografia gasosa, através do Sistema de Identificação Microbiana MIDI Sherlock[®], com base em suas composições de membrana celular, levando em consideração tanto os ácidos graxos identificados como a sua abundância relativa.

4.2.3 Perfil de resistência

O perfil de resistência dos isolados, foi determinado através do método de difusão em placas de ágar *Mueller Hinton* conforme descrito por Bauer *et al.* (1966). Os isolados foram reativados no caldo BHI, incubados a 37°C até obtenção de turvação conforme a escala 0,5 de Mac Farland, em seguida foi adicionado 10µL desta cultura, semeados em placas de Petri contendo ágar *Mueller Hinton*, com auxílio de swab. Logo após, foram aplicados os discos (Sensidisc - DME[®] / Sensifar-Vet – Cefar[®]) impregnados com as drogas antimicrobianas, amoxicilina 10µg, ampicilina 10µg, sulfametoxazol 23,75µg + trimetoprima 1,25µg (25µg), gentamicina 10µg, enrofloxacin 05µg, cefalexina 30µg, ceftiofur 30µg; sendo estes agentes antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina nas propriedades onde foram realizadas as coletas. Após incubados a 37°C por 24 horas, foi realizada a leitura dos halos, onde os resultados foram interpretados com base nos critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015, 2018, 2020) e Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCast, 2021). A interpretação do tamanho do halo de inibição para *Bacillus* spp. foi segundo o trabalho de Behravan e Rangsaaz, (2004) e do antimicrobiano amoxicilina para os isolados *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. foi usado o trabalho de Freitas *et al.* (2018), enquanto o trabalho de Silva (2015) foi utilizado como referência para *Nocardia* spp. Houve a necessidade de buscar diferentes documentos, os quais foram acima citados, para a interpretação dos halos de inibição dos antimicrobianos utilizados, por não haver dados suficientes em uma única referência para todas as bactéria isoladas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Ocorrência de Mastite

Observou-se que a propriedade localizada no município de Campo Verde apresentou menor ocorrência da mastite proporcionalmente ao número de animais (Tabela 2), porém maior percentual de mastite clínica, e um maior número de tetos afetados por animal frente às demais propriedades.

Tabela 2 - Ocorrência de mastite bovina em três propriedades do interior do estado de Mato Grosso.

| Município/Propriedade | Animais examinados | Mastite (%) | Tipo de Mastite (%) | |
|-----------------------|-----------------------|----------------|---------------------|---------------|
| | | | Clínica | Subclínica |
| Cáceres - MT | 42 | 10 (23,80) | 0 (0) | 10 (23,80) |
| Araputanga - MT | 52 | 10 (19,23) | 1 (1,92) | 9 (17,31) |
| Campo Verde - MT | 60 | 11 (18,33) | 5 (8,33) | 6 (10) |
| Total | 154 | 31 | 6 | 25 |

Sabe-se que os animais da propriedade de Campo Verde são da raça Holandesa, raça de maior produção de leite e menor adaptabilidade a diferentes climas e sistemas de produção; e nas propriedades de Araputanga e Cáceres, os rebanhos são mestiços formados pela raça girolando 3/4 e 5/8, respectivamente. O bovino mestiço girolando apresenta maior adaptabilidade a diferentes climas e sistemas de produção, além de menor predisposição à mastite (SANTANA, 2018).

Além disto, tal propriedade ainda realizava medida preventiva, fornecendo suplemento homeopático na ração dos animais, e o uso de antimicrobianos para tratamento era realizado de maneira reduzida. Infere-se que o maior percentual de mastite clínica e tetos acometidos por animal nesta propriedade poderia estar associada à conduta de tratamento tardio.

Embora o aceitável seja que uma propriedade leiteira apresente uma porcentagem de animais com mastite menor que 2% para mastite clínica, e menor que 15% para mastite subclínica (MULLER, 2002), foi observado valores maiores nas propriedades estudadas.

Um estudo realizado no município de Nova Santa Helena (MT), com 408

vacas amostradas, 62 (15,19%) foram diagnosticadas com mastite subclínica (LIMA *et al.*, 2013). Em um outro estudo em propriedades leiteiras da microrregião de Cuiabá (MT), onde 108 animais foram amostrados, 92 (85,2%) apresentaram mastite em pelo menos um quarto mamário (MARTINS *et al.*, 2010). Silva *et al.* (2017), trabalhando com um rebanho no município de Carlinda (MT), onde há uma maior produção leiteira em relação aos demais municípios do estado de MT, registrou uma prevalência de 87,5% para mastite.

Em rebanhos leiteiros de propriedades da região Noroeste Paulista, 30,5% apresentaram mastite de um total de 239 vacas em lactação (PINTO *et al.*, 2021). No estado de Minas Gerais, maior produtor de leite no Brasil, com uma participação de 27,1% da produção nacional (INSTITUTO..., 2021), foi relatada a maior prevalência de mastite nos rebanhos. Entre os estudos de MG, Cunha *et al.* (2016) avaliou 617 animais de 44 rebanhos leiteiros em propriedades de médio e pequeno porte na região de Viçosa (MG), revelando uma prevalência média de mastite subclínica de 55,4%.

4.3.2 Isolados obtidos

Dentre os gêneros identificados, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentaram maior frequência (Tabela 3). Os isolados de *S. aureus* foram confirmados por PCR pela presença dos genes *femA* e *nuc*, sendo a espécie bacteriana de maior frequência. A detecção do gene *femA* é importante como estratégia de monitoramento do padrão de resistência à meticilina, uma vez que a transmissão de *S. aureus* resistente à meticilina pode causar sérios problemas entre humanos e animais (NEAMAH *et al.*, 2019).

Tabela 3 - Frequência dos isolados bacterianos identificados de mastite em rebanhos de bovinos leiteiros dos municípios de Cáceres, Araputanga e Campo Verde, estado de Mato Grosso.

| Bactérias | Frequência | |
|---------------------------------|------------|------------|
| | n | (%) |
| <i>Staphylococcus</i> spp. | 13 | 43,33 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 06 | 20 |
| <i>Streptococcus</i> spp. | 01 | 3,33 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 02 | 6,66 |
| <i>Bacillus</i> spp. | 01 | 3,33 |
| <i>Bacillus cereus</i> | 02 | 6,66 |
| <i>Corynebacterium bovis</i> | 02 | 6,66 |
| <i>Enterococcus</i> spp. | 01 | 3,33 |
| <i>Listeria</i> spp. | 01 | 3,33 |
| <i>Nocardia</i> spp. | 01 | 3,33 |
| Total | 30 | 100 |

n = número de isolados.

Nas propriedades pertencentes os municípios de Araputanga e Cáceres, os isolados de *Staphylococcus* spp. corresponderam a 60% (03/05) e 44,45%(04/09), enquanto *S. aureus* foram 40% (02/05) e 44,4% (04/09) respectivamente, sendo isolado apenas um *Streptococcus* spp. na propriedade de Cáceres; nestas, houve um maior percentual de mastite subclínica quando comparadas à propriedade de Campo Verde.

Observou uma maior diversidade bacteriana no leite obtido de animais com mastite da propriedade de Campo Verde, onde foi identificado: 6,25% de *Enterococcus* spp. (01/16), 12,5% de *Corynebacterium bovis* (02/16), 6,25% *Bacillus* spp. (01/16), 12,5% *B. cereus* (02/16), 6,25% *Listeria* spp. (01/16), 6,25% *Nocardia* spp. (01/16), 12,5% *Streptococcus agalactiae* (02/16) e 50% *Staphylococcus* spp.(06/16). Sabe-se que em todas as propriedades as amostras de leite foram coletadas da mesma forma, seguindo procedimentos de coleta de acordo com (DOHOO *et al.*, 2011), acondicionadas e manipuladas igualmente.

A identificação das bactérias isoladas de mastite dos rebanhos bovinos estudados por propriedade encontra-se no material suplementar 1.

Nas três propriedades leiteiras avaliadas, *S. aureus* mantém-se como principal agente isolado de mastite bovina. Assim como os resultados encontrados, vários estudos apontam *S. aureus* como principal patógeno associado à mastite bovina (TEIXEIRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2018; GIARDINI

et al., 2016).

Trabalhos realizados em propriedades leiteiras localizadas na microrregião de Cuiabá (MT), verificaram uma maior prevalência de bactérias do gênero *Staphylococcus* (MARTINS *et al.*, 2006, 2010). Em propriedades localizadas no município de Cáceres, Almeida *et al.* (2022) encontrou maior contaminação por *S. aureus*, 56,81% (50/88) entre os isolados de amostras de leite cru provenientes de tanques de resfriamento.

No estudo realizado em Minas Gerais por Teixeira *et al.* (2014), das 251 amostras de leite cru analisadas em cinco microrregiões produtoras de leite de Minas Gerais (Central Mineira, Noroeste de Minas, Vale do Mucuri, Região Metropolitana, Vale do Rio Doce) foi possível obter 278 colônias, sendo 100% destas identificadas como *S. aureus* utilizando métodos fenotípicos, microbiológicos e pela presença do gene *femA* (TEIXEIRA *et al.*, 2014). No presente trabalho dois *S. aureus* identificados pelo gene *nuc* não apresentaram *femA* (meticilina resistente).

A maior frequência de *S. aureus* também pôde ser observada em outras regiões do país, como no nordeste do Brasil, com 48% de *S. aureus* dentre os microrganismos identificados, e no Rio Grande do Sul com 90% da espécie *S. aureus* entre os isolados do gênero *Staphylococcus* (COSTA *et al.*, 2018; FREITAS *et al.*, 2018).

Estudos sobre a etiologia da mastite em outros países, como Estados Unidos da América (EUA), Índia, Turquia e Quênia também descrevem a maior frequência de *Staphylococcus* spp. (SAGLAM, 2017; MBINDYO, 2020; KRISHNAMOORTHY, 2021).

Os gêneros *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Listeria* spp. e *Nocardia* spp. foram menos frequentes entre os isolados obtidos no presente trabalho e já foram descritos na literatura como patógenos em infecções intramamárias bovinas (HEIKKILA *et al.*, 2018; SUMON *et al.*, 2020). Apesar da menor frequência destas bactérias como agentes causadores de mastite, estes patógenos não devem ser negligenciados, uma vez que também estão associados ao comprometimento da qualidade e alteração de componentes do leite, além de poder causar danos à saúde humana (CONDAS *et al.*, 2013; VEYSSEYRE *et al.*, 2015).

Após a identificação de três isolados do gênero de *Bacillus* spp. por características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, foi realizada a identificação da espécie utilizando o sistema MIDI. Dois isolados de *Bacillus* spp. (isolado 1 e 2) foram

identificados pelo índice de similaridade como *B. cereus*, e o isolado 3 apresentou hit de similaridade alto com *B. cereus* e *B. thuringiensis*, não sendo possível discernir entre estas duas espécies pelo método utilizado (Tabela 4).

Tabela 4 - Confirmação de isolados de *Bacillus* spp. de acordo com banco de dados do sistema SHERLOCK® e a biblioteca RTSBA6 6,21.

| <i>Bacillus</i> sp. | Índice de similaridade | Nome de entrada – Biblioteca RTSBA6 6,21 |
|----------------------------|-------------------------------|---|
| Isolado 1* | 0.794 | <i>Bacillus-cereus-GC subgroup A</i> |
| | 0.605 | <i>Bacillus-thuringiensis-israelensis</i> |
| | 0.477 | <i>Bacillus-thuringiensis-kurstakii</i> |
| Isolado 2* | 0.749 | <i>Bacillus-cereus-GC subgroup A</i> |
| | 0.657 | <i>Bacillus-cereus-GC subgroup B</i> |
| | 0.530 | <i>Bacillus-thuringiensis-kurstakii</i> |
| Isolado 3 | 0.791 | <i>Bacillus-thuringiensis-kurstakii</i> |
| | 0.777 | <i>Bacillus-cereus-GC subgroup A</i> |
| | 0.726 | <i>Bacillus-thuringiensis-israelensis</i> |

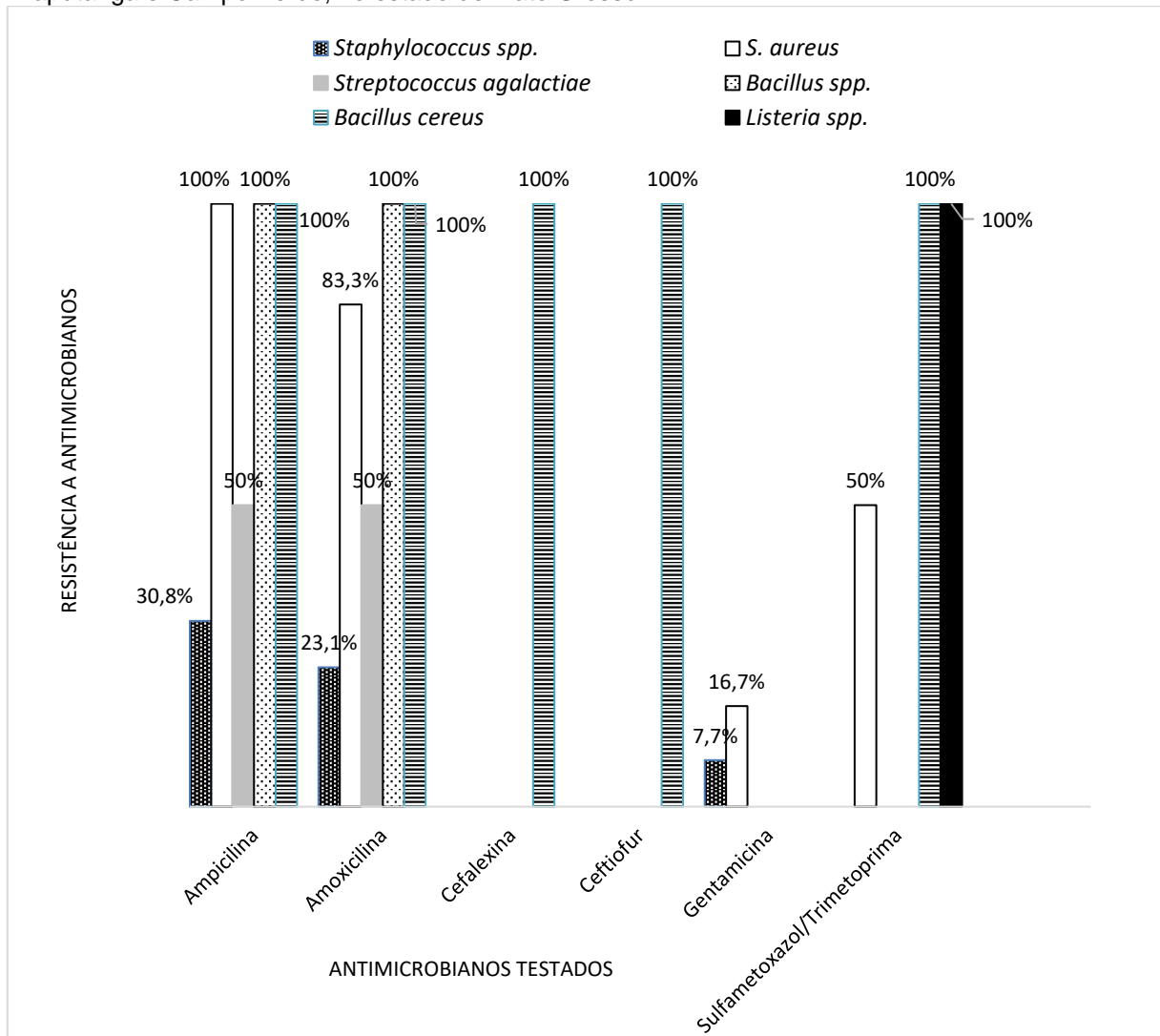
* Isolados identificados como *Bacillus cereus*.

Veysseyre *et al.* (2015) descreveu *Bacillus* spp. relacionados a problemas de saúde em humanos, como doenças gastrintestinais e até mesmo como causador de infecções em outros sistemas, podendo levar a óbito. Este gênero é pouco documentado como agente causador de mastite, sendo *B. cereus* a espécie mais prevalente e normalmente como agente oportunista. Apesar da baixa incidência, os danos ao tecido mamário e ao animal podem ser severos (SCHEIFER *et al.*, 1976; RADOSTITS *et al.*, 2002; BETTANIN *et al.*, 2019).

4.3.3 Perfil de resistência

Nenhum dos isolados testados foi resistente à enrofloxacina, e a maior resistência pôde ser observada nos isolados de *S. aureus* e *B. cereus* às aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) e sulfametoxazol + trimetoprima. Estes antimicrobianos estão presentes em duas classes, e são amplamente utilizados para o tratamento da mastite nas propriedades onde as amostras foram coletadas (Figura 2).

Figura 2 - Perfil de resistência de bactérias isoladas de mastite bovina nos municípios de Cáceres, Araputanga e Campo Verde, no estado de Mato Grosso.



Apesar de *S. aureus* apresentar a maior frequência (Tabela 3) frente as demais espécies de bactérias isoladas, a resistência individual destes isolados foi a um número reduzido de antimicrobianos, ainda que tenha sido detectado o gene *femA* na maioria destes isolados. A presença de cepas resistentes à meticilina (MRSA), pela presença do gene *femA*, é foco de vários estudos, sendo preocupante em termos de saúde pública, pois estão comumente relacionadas a infecções hospitalares, especialmente nas unidades de terapia intensiva -UTI (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Dentre as quatro classes de antimicrobianos testadas, 83,33% de *S. aureus* apresentaram resistência somente às penicilinas (ampicilina e amoxicilina), dois foram resistentes a β -lactâmicos e sulfonamidas, enquanto um isolado apresentou resistência à três classes de antimicrobianos (β -lactâmicos, sulfonamidas e

aminoglicosídeos), sendo condizente com um isolado multirresistente segundo Magiorakos *et al.* (2012). Os perfis de resistência para cada isolado encontram-se no material suplementar.

Um maior percentual de *S. aureus* resistentes às penicilinas foi encontrado também em isolados de mastite em vacas de Alagoas, Bahia e Pernambuco, onde observou-se que dos 161 isolados de *S. aureus* identificados, 77,6% apresentaram resistência à amoxicilina, 67,7% à ampicilina, 1,2% à gentamicina, enquanto nenhum apresentou resistência à sulfametoxazol + trimetoprima (SANTOS, 2018).

Resultados semelhantes relacionados à resistência por *B. cereus* apresentados nesta pesquisa foram descritos por Molina e Rivadeneira (2008). Em uma amostragem realizada em 20 propriedades de gado leiteiro do Equador, dos 294 isolados estudados, apenas um foi identificado como *B. cereus*, apresentando resistência a quase todos os antibióticos testados (cefalexina, cloxacilina, penicilina, sulfametoxazol/trimetoprima, amoxicilina e ácido clavulânico), exceto para enrofloxacin e tetraciclina.

Visto que, o estado de Mato Grosso objetiva uma melhor posição quanto a pecuária leiteira nacional; estudos como este, e que visem entender o perfil das propriedades produtoras de leite do estado devem ser incentivados, na tentativa de minimizar os problemas que possam estar relacionados a uma baixa qualidade e quantidade do produto, ou mesmo melhorar o processo operacional nestas propriedades. Dado que o estado possui uma grande área de pastagem e uma topografia favorável à pecuária de corte, Mato Grosso também tem potencial para ocupar uma posição de maior destaque no cenário da pecuária leiteira nacional, alavancando o setor e contribuindo para a geração de empregos.

4.4 CONCLUSÃO

A ocorrência de mastite entres os animais das propriedades amostradas ficou acima dos níveis ideais, sendo *S. aureus* principal causador da mastite nos rebanhos estudados. Apesar dos dados apontarem um perfil de resistência relativamente baixo, quando comparado a outras regiões leiteiras no Brasil, os isolados de *Bacillus*, gênero bacteriano não comumente isolados de leite mastítico, apresentaram maior resistência frente as demais bactérias frequentemente isoladas de mastite bovina. Informações como as descritas por este trabalho podem se tornar preditivos para implementação

de medidas de controle e tratamento dessa enfermidade em rebanhos, minimizando as perdas e auxiliando numa melhor posição no ranking da pecuária leiteira.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. V.; ANJOS, T. R.; DIAS, N. S.; CUNHA-NETO, A.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CARVALHO, R. C. T. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from raw milk sampled from cooling tanks and their antimicrobial resistance profiles. **Acta Veterinaria Brasilica (UFERSA)**, v. 1, p. 1, 2022.

BAUER, A. W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-506, 1966. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5325707/>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

BEHRAMAN, J.; RANGSAAZ, Z. Detection and characterization of beta-lactam resistance in *Bacillus cereus* PTCC 1015. **Scientific World Journal**, v. 4, 622-627, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5956378/>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

BETTANIN, J; et al. Frequência de Isolamentos dos Agentes Etiológicos da Mastite Bovina no Sudoeste Paranaense. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 13, n. 4, p. 440-451, 2019. Disponível em: <<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/54>>. Acesso em: 22 out. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário do leite**. Brasília, DF: EMBRAPA), 2019a. p. 104.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Embrapa Agrossilvipastoril**: Transferência de tecnologia em pecuária leiteira Brasília, DF: EMBRAPA, 2019b. p. 646-650.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**, 2021.

CIDADE BRASIL. **Cidades do Brasil**. Disponível em :<<https://www.cidade-brasil.com.br>>. Acesso em: 22 out. 2021.

CLSI. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria M45**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI. **Supplement M100**. 25th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI. **Supplement M100**. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI. **Supplement M100**. 31th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

CONDAS, L. et al. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* spp. isolated from bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3-4, p. 708-712, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24060098/>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

COSTA, F. N. et al. Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 50, n. 5, p. 1089-1097, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv6n12-340>>. Acesso em: 22 maio 2021.

DA CUNHA, A. F. et al. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 48-54, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.21708/avb.2016.10.1.5476>>. Acesso em: 12 mar. 2021.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and molecular biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937522/>>. Acesso em: 14 maio 2021.

DIAS, N. L. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v. 63, n. 6, p. 1547-1552, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/VDyWCjr67dj5N3kT3xFMPfb/abstract/?lang=p>>. Acesso em: 11 maio 2021.

DOHOO, I. et al. Diagnosing intramammary infections: Comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5515-5522, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22032374/>>. Acesso em: 11 maio 2021.

FARRELL, S. et al. Understanding farmers' and veterinarians' behavior in relation to antimicrobial use and resistance in dairy cattle: A systematic review. **Journal of Dairy Science**, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33612225/>>. Acesso em: 18 fev. 2021.

FREITAS, C. H. et al. Identificação e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite bovina em propriedades leiteiras de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 661-666, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.17921/1415-5141.2020v24n1p58-64>>. Acesso em: 18 dez. 2021.

GIRARDINI, L. K. et al. Perfil de resistência a antimicrobianos de grupos clonais de *Staphylococcus aureus* isolados de pequenas propriedades leiteiras do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 951-956, 2016. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/pvb/a/XT5t96q4s5NQJpqxkrHjYxt/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 22 fev. 2021.

HEIKKILÄ, A. M. et al. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 10, p. 9493-9504, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30122416/>>. Acesso em: 10 Jul. 2021.

INSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DE MATO GROSSO (INDEA/MT). **Pecuária de MT quebra novo recorde e rebanho atinge 32,7 milhões de cabeças**. Cuiabá: INDEA/MT, fev. 2022. Disponível em: <<http://www.indea.mt.gov.br/-/18851655-pecuaria-de-mt-quebra-novo-recorde-e-rebanho-atinge-32-7-milhoes-de-cabecas>>. Acesso em: 2 fev. 2022.

KRISHNAMOORTHY, P. et al. An understanding of the global status of major bacterial pathogens of milk concerning bovine mastitis: A systematic review and meta-analysis (Scientometrics). **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 545, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33946571/>>. Acesso em: 10 jul. 2021.

LIMA, R. R. et al. Occurrence of Mastitis and Associated Risk Factors in Dairy Cattle from Nova Santa Helena, Mato Grosso, Brazil. **Scientific Electronic Archives**, v. 4, p. 5-10, 2013. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9438>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21793988/>>. Acesso em: 24 jul. 2021.

MARTINS, R. P. et al. Prevalência e etiologia infecciosa de mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MARTINS, R. P.; NETO, A.; MARQUES, M. R. H. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 139, p. 104-110, 2006. Disponível em: <<https://hal.inrae.fr/hal-02658838/document>>. Acesso em: 24 jul. 2021.

MBINDYO, C. M. et al. Prevalence, etiology, and risk factors of mastitis in dairy cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. **Veterinary medicine international**, v. 2020, 2020. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/vmi/2020/8831172/>>. Acesso em: 24 jul. 2021.

MCDUGALL, S. et al. Factors influencing antimicrobial prescribing by veterinarians and usage by dairy farmers in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 65, n. 2, p. 84-92, 2017.

MOLINA, V.; RIVADENEIRA, A. **Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha**. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas, 2008. p. 34-49.

- MÜLLER, E. E. et al. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, v. 2, n. 2002, p. 206-217, 2002.
- NADER, A. et al. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657v74p0012007>>. Acesso em: 18 maio 2021.
- NEAMAH, A. J. et al. Molecular and phylogenetic study of *Staphylococcus aureus* isolated from human and cattle of Al-Qadisiyah Governorate, Iraq. **Veterinary World**, v. 12, n. 9, p. 1378, 2019.
- PINTO, M. S. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina em propriedades rurais da região Noroeste Paulista. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 19184-19192, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-525>>. Acesso em: 28 maio 2021.
- QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002.
- SAĞLAM, A. G. et al. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. **Veterinary World**, v. 10, n. 12, p. 1481-1495, 2017.
- SANTANA, R. S. **Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções genotípicas Holandês-Gir**. 2018. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, AL, 2018.
- SANTOS, A. S. **Análise dos perfis genotípico e fenotípico de resistência a beta-lactâmicos em *Staphylococcus spp.* isolados de mastite em ruminantes**. 2018, 106 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2018.
- SCHIEFER, B. et al. Patologia da mastite por *Bacillus cereus* em vacas leiteiras. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 17, n. 9, p. 239-243, 1976.
- SILVA, A. C. et al. A prevalência de mastites em vacas leiteiras do município de Carlinda (MT), no ano de 2016. **PUBVET**, v. 11, n. 8, p. 761-766, ago. 2017.
- SILVA, E. C. M. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados do gênero *Nocardia* e proposição de algoritmo de identificação**. 2015, 97 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional) - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolones x bacterial resistance on veterinary medicine. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 2, p. 363-369, 2010.
- SUMON, S. M; MOSTAFIZUR, R. Dynamics of somatic cell count and intramammary

infection in lactating dairy cows. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 7, n. 2, p. 314, 2020.

TEIXEIRA, J. P. et al. Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *femA* e *mecA* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 3, p. 272-279, 2014.

VEYSSEYRE, F. et al. *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. **Med Mal Infect.**, v. 45, n. 11-12, p. 436-440, 2015.

YANG, Y. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in dairy products by polymerase chain reaction assay. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 7, p. 857-862, 2007.

MATERIAL SUPLEMENTAR I

Quadro 1 - Antibiograma realizado de isolados obtidos de propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso.

| ISOLADO | MUNICÍPIO | ANTIMICROBIANOS | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------|-----------------|-------------------|--------------------|------------------------------------|-----------------|---------------|
| | | μg | | | | Aminoglicosídeo | Fluoroquinolona | Sulfonamida |
| | | <i>B- lactâmicos</i> | | | | | | |
| Ampicilina 10 | Amoxicilina 10 | Cefalexina 30 | Ceftiofur 30 | Gentamicina 10 | Enrofloxacina 5 | Sulfametoxazol/ Trimetoprima 25 | | |
| 1- <i>Listeria</i> spp. | Campo verde | - | - | Sensível | - | - | - | Resistente |
| 2- <i>Corynebacterium bovis</i> | Campo verde | - | - | Sensível | - | Resistente | - | - |
| 3- <i>Staphylococcus</i> spp. | Campo verde | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 4- <i>Streptococcus agalactie</i> | Campo verde | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Intermediário |
| 5- <i>Streptococcus agalactie</i> | Campo verde | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Intermediário |
| 6- <i>Staphylococcus</i> spp. | Campo verde | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 7- <i>Staphylococcus</i> spp. | Campo verde | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 8- <i>Staphylococcus</i> spp. | Campo verde | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 9- <i>Nocardia</i> spp. | Campo verde | - | - | - | - | - | - | Sensível |
| 10- <i>Enterococcus</i> spp. | Campo verde | Sensível | Sensível | Sensível | - | - | - | - |
| 11- <i>Staphylococcus</i> spp. | Campo verde | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Resistente | Sensível | Sensível |
| 12- <i>Bacillus cereus</i> | Campo verde | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | - | - | Resistente |
| 13- <i>Bacillus cereus</i> | Campo verde | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | - | - | Resistente |
| 14- <i>Bacillus</i> spp. | Campo verde | Resistente | Resistente | - | - | - | - | - |
| 15- <i>Staphylococcus</i> spp. | Campo verde | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 16- <i>Corynebacterium bovis</i> | Campo verde | - | - | Sensível | - | Sensível | - | - |
| 17- <i>Staphylococcus aureus</i> | Cáceres | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 18- <i>Staphylococcus aureus</i> | Cáceres | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Resistente | Sensível | Resistente |
| 19- <i>Staphylococcus aureus</i> | Cáceres | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 20- <i>Staphylococcus</i> spp. | Cáceres | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |

Discos antimicrobianos Sensidisc - DME® / Sensifar-Vet – Cefar®. Perfis de resistência determinados de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015, 2018, 2020) e Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCast 2021); para *Bacillus* sp. segundo Behravan e Rangsaaz, (2004), amoxicilina para os isolados *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Freitas *et al.* (2018), e Silva (2015) para *Nocardia* sp. - não houve avaliação de perfil resistência para isolado/antimicrobiano por falta de padrões definidos.

Quadro 1 (Cont.) - Antibiograma realizado de isolados obtidos de propriedades leiteiras do estado de Mato Grosso.

| ISOLADO | MUNICÍPIO | ANTIMICROBIANOS | | | | | | |
|----------------------------------|------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|--------------------|---------------------------------------|
| | | B- lactâmicos | | | | Aminoglicosídeo | Fluoroquinolona | Sulfonamida |
| | | Ampicilina 10 | Amoxicilina 10 | Cefalexina 30 | Ceftiofur 30 | Gentamicina 10 | Enrofloxacina 5 | Sulfametoxazol/ Trimetoprima 25 |
| 21- <i>Staphylococcus</i> spp. | Cáceres | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 22- <i>Staphylococcus</i> spp. | Cáceres | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 23- <i>Streptococcus</i> spp. | Cáceres | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 24- <i>Staphylococcus aureus</i> | Cáceres | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 25- <i>Staphylococcus</i> spp. | Cáceres | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 26- <i>Staphylococcus aureus</i> | Araputanga | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Resistente |
| 27- <i>Staphylococcus aureus</i> | Araputanga | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Resistente |
| 28- <i>Staphylococcus</i> spp. | Araputanga | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 29- <i>Staphylococcus</i> spp. | Araputanga | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |
| 30- <i>Staphylococcus</i> spp. | Araputanga | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível |

Discos antimicrobianos Sensidisc - DME® / Sensifar-Vet – Cefar®.

Perfis de resistência determinados de acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015, 2018, 2020) e Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCast 2021); amoxicilina para os isolados *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Freitas *et al.* (2018).

**5 CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2 - POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE SUBSTÂNCIAS
BIOATIVAS EM *BACILLUS CEREUS* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

Potencial antimicrobiano de substâncias bioativas em *Bacillus cereus* isolados de mastite bovina.

RESUMO

ALVES, T. C. S. **Potencial antimicrobiano de substâncias bioativas em *Bacillus cereus* isolados de mastite bovina.** 2022. Tese (Doutorado Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2022.

Bacillus cereus é uma bactéria gram-positiva, aeróbio facultativa e formadora de esporos. Pode ser isolada em grande variedade de alimentos, sendo responsável por surtos de intoxicação alimentar; e em ambiente hospitalar causando infecções nosocomiais. Apesar de pouco documentada como agente causador da mastite bovina, cepas multirresistentes podem se tornar um problema de saúde pública, visto estar relacionado a toxinfecções alimentares. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar *Bacillus cereus* isolados de mastite bovina quanto a presença de genes de virulência, a formação de biofilmes, e avaliar o potencial antimicrobiano de substâncias bioativas extraídas de plantas frente a estes isolados. Para dois isolados (*Bacillus cereus* 1 e 2) resistentes à ampicilina, amoxicilina, sulfametoxazol + trimetoprima, cefalexina e ceftiofur, foi avaliado o perfil de virulência por PCR através da amplificação dos genes para hemolisina (*hblA*, *hblC*, *hblD*), citotoxina K, cereulida, regulador pleiotrópico e enterotoxina não hemolítica. A concentração inibitória mínima, concentração bactericida mínima e a produção de biofilmes foram avaliadas por densidade ótica, e as associações entre as substâncias bioativas com os antimicrobianos pelo teste de Checkboard. Os dois isolados apresentaram genes para hemolisina (*hblA*, *hblC*, *hblD*), além da citotoxina K, cereulida e regulador pleiotrópico. A CIM e CBM da substância bioativa 7-epiclusianona sobre *B. cereus* 1 foi de 1,95µg/mL e 3,9µg/mL para *B. cereus* 2. A CIM da gutiferona-A para *B. cereus* 1 e 2 corresponderam a 7,81µg/mL e 15,62µg/mL, respectivamente, também apresentando ação bactericida. Os testes de interação entre antimicrobianos e substâncias bioativas revelaram um sinergismo significativo da 7-epiclusianona e gutiferona-A quando associadas aos antimicrobianos ampicilina e amoxicilina; resultando também na redução da produção de biofilme pela associação da gutiferona-A com ampicilina. Os resultados demonstram o potencial antimicrobiano dos bioativos 7-epiclusianona e gutiferona-A, frente a associação com ampicilina e amoxicilina, indicado uma ótima perspectiva para o tratamento da mastite bovina causada por *B. cereus*.

Palavras-chave: Bactéria. Gutiferona-A. Leite. Ruminante. Sinergismo. 7-epiclusianona.

ABSTRACT

ALVES, T. C. S. **Antimicrobial potential of bioactive compounds in *Bacillus cereus* isolates of bovine mastitis.** 2022. Thesis (Animal Bioscience Doctorate) – University of Cuiabá, Cuiabá, 2022

Bacillus cereus is a gram-positive, spore-forming, and facultatively aerobic bacteria. It can be isolated from a wide variety of foods, being responsible for outbreaks of food poisoning; and, in a hospital setting, it begets nosocomial infections. Although poorly documented as a causing agent of bovine mastitis, multi-resistant strains can become a public health issue, since they are associated with food poisoning. In this context, this work aimed to characterize *Bacillus cereus* isolates from bovine mastitis regarding the presence of virulence genes, biofilm formation, and evaluate the antimicrobial potential of bioactive substances extracted from plants against these isolates on these bacteria. In two isolates (*Bacillus cereus* 1 e 2) resistant to ampicillin, amoxicillin, sulfamethoxazole + trimethoprim, cephalixin, and ceftiofur, it was evaluated the virulence profile by PCR through the amplification of hemolysin genes (*hblA*, *hblC*, *hblD*), cytotoxin K, cereulide, pleiotropic regulator and non-hemolytic enterotoxin. The minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal concentration, and the biofilm production were evaluated by optical density, and the interactions between bioactive substances and antimicrobials by the Checkerboard test. Both isolates presented genes for hemolysin (*hblA*, *hblC*, *hblD*) in addition to the cytotoxin K, cereulide, and pleiotropic regulator. The MIC and MBC of the bioactive substance 7-epiclusianone on *B. cereus* 1 was of 1,95µg/mL and 3,9 µg/mL for *B. cereus* 2. The MIC of the guttiferone-A for *B. cereus* 1 and 2 corresponded to 7,81 µg/mL and 15,62 µg/mL respectively, also presenting bactericidal action. In the interaction tests between antimicrobials and bioactive compounds, the 7-epiclusianone and the guttiferone-A exhibited significant synergism when associated with ampicillin and amoxicillin; also, resulting in the reduction of the biofilm production by the association of guttiferone-A with ampicillin. These results demonstrated the antimicrobial potential of the bioactives 7-epiclusianone and guttiferone-A against the association with ampicillin amoxicillin, indicating a great perspective for the treatment of bovine mastitis caused by *B. cereus*.

Keywords: Bacteria. Guttiferone-A. Milk. Ruminant. Synergy. 7-epiclusianone.

5.1 INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é um bacilo Gram-positivo, formador de esporos, aeróbio facultativo, amplamente distribuído no ambiente. Esta bactéria mesófila se desenvolve em condições de temperatura moderada, variando entre 10°C e 45°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento está entre 28°C e 35°C (DROBNIEWSKI, 1993; JAY, 2005).

A grande capacidade de resistência dos endósporos formados por *Bacillus* spp. favorece sua resistência a agentes químicos e físicos, altas temperaturas, variação de pH e sanitizantes; possibilitando seu crescimento e persistência em diferentes nichos (STENFORS *et al.*, 2008).

Devido à sua resistência a variações de temperatura, *B. cereus* pode ser isolado em uma grande variedade de alimentos processados, incluindo leite e derivados lácteos, inclusive leite UHT e leite pasteurizado, tornando-se uma grande preocupação na indústria de laticínios, mesmo que comumente encontrados em níveis aceitáveis em termos de saúde pública (menos de 10² UFC/g). Produtos lácteos contaminados com *B. cereus* podem ser potencialmente perigosos para o consumo humano, uma vez que a exposição a temperaturas inadequadas pode comprometer a conservação do alimento, favorecendo a multiplicação destes microrganismos a níveis significativos (acima de 10⁵ UFC/g), predispondo à intoxicação alimentar, ocasionando síndrome emética e síndrome diarreica (PAIVA, 2009; CHAVES *et al.*, 2017). A instrução normativa N° 60 (23/12/2019) estabelece normas para a presença de bactérias aeróbicas mesófilas em produtos lácteos em pó, incluindo leite, compostos lácteos, soro de leite e concentrados proteicos de leite ou de soro não deve ter mais que 3x10⁴ UFC/mL (BRASIL, 2019).

Além das doenças gastrointestinais *B. cereus* tem sido descrito frequentemente como agente causador de infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos, por se tratar de cepas altamente patogênicas possuindo semelhanças ao *B. anthracis*, ocasionando quadros de infecções pulmonares progressiva semelhante ao antraz, uma vez que estas cepas de *B. cereus* possuíam plasmídeo de virulência pXO1 que codifica a toxina letal do *B. anthracis* (HOFFMASTER *et al.*, 2004; AVASHIA *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2019; ODA *et al.*, 2020).

Muitas vezes, ao ser isolado em uma amostra clínica, *B. cereus* é considerado um contaminante pouco significante; porém esta bactéria tem sido descrita como

causadora de várias condições clínicas, como surtos de bacteremia, endoftalmite, sepse fulminante, infecções devastadoras do sistema nervoso central, endocardite, acometendo preferencialmente indivíduos imunossuprimidos, usuários de drogas intravenosas e recém-nascidos (MANICKAM *et al.*, 2008; BOTTONE, 2010; SASAHARA *et al.*, 2011; YAMADA *et al.*, 2019).

Pesquisas vem sendo realizadas para identificar a presença de genes responsáveis pela produção de toxinas por *B. cereus*, como cereulida (*clo*), hemolisina BL (*hbl*), enterotoxina não hemolítica (*Nhe*), citotoxina K (*cytk*); considerando que a produção de muitas destas toxinas está diretamente relacionada ao fator de transcrição PlcR que controla a transcrição de pelo menos 15 genes que codificam a expressão de fatores de virulência. Estudos revelam que a ação pleiotrópica de PlcR requer PapR, formando o sistema PlcR-PapR; de extrema relevância para patogenicidade bacteriana, pois dificulta a resposta imediata relacionada à imunidade inata do hospedeiro (SALAMITOU *et al.*, 2000; POMERANTSEV *et al.*, 2003; GOHAR *et al.*, 2008; ODA *et al.*, 2020).

Embora *B. cereus* seja pouco documentado como agente causador da mastite bovina e considerado um patógeno incomum, atuando como oportunista, muitas vezes associado a contaminações cirúrgicas e a lesões nos tetos, este pode causar uma mastite gangrenosa e hiperaguda, acarretando secreções anormais pelas glândulas mamárias, um grau muito acentuado de dano tecidual, levando à necrose do tecido mamário e até mesmo o óbito do animal (SCHEIFER *et al.*, 1976; PARKINSON *et al.*, 1999; RADOSTITS *et al.*, 2002; BETTANIN *et al.*, 2019).

Em alternativa a resistência de patógenos humanos e animais à diferentes classes de antimicrobianos, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com substâncias extraídas de plantas originárias da biodiversidade da flora brasileira, avaliando suas atividades farmacológicas, sobretudo ações anti-inflamatórias, antineoplásica, anti-hipertensiva, antiarrítmica, analgésica e antimicrobiana. Vários compostos bioativos tornaram-se candidatos ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (BARROS *et al.*, 2017; MAIA *et al.*, 2018; CORREA, 2018); contribuindo na diminuição do uso de antimicrobianos tradicionais e conseqüentemente na resistência bacteriana, fato este que vem alarmando o mundo.

A mangiferina é um composto polifenólico comumente encontrado na casca, frutos e folhas, da manga *Mangifera indica* L. (PAN *et al.*, 2018). O uso da mangiferina interrompe consideravelmente a resposta inflamatória, além de possuir atividades

antiproliferativa, antioxidativa e anti-carcinogênica (ZHANG; YUE, 2016).

Pesquisas anteriores avaliaram a atividade antibacteriana do β -cariofileno contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de potencializar a ação de antimicrobianos reduzindo as chances de resistência (GOREN *et al.*, 2011; DAHHAM *et al.* 2015; SELESTINO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021).

Trabalhos de triagem para a busca de moléculas bioativas provenientes de plantas brasileiras, isolou a partir do extrato dos frutos da *Garcinia brasiliensis* (Bacupari) uma benzofenona poliprenilada a gutiferona A A (gut-A) e outra distinta das gutiferonas a 7-epiclucianona (7-epi), demonstrando atividade leishmanicida significativa para estas duas biomoléculas (SANTOS *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2010). Em outro estudo, a gutiferona A foi isolada do extrato etanólico das sementes dessa planta e os resultados apontaram que esta molécula bioativa possui ação antimicrobiana mais relevante sobre bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *B. cereus* (NALDONI *et al.*, 2009).

Barros *et al.* (2017) e Maia *et al.* (2018) verificaram uma atividade antimicrobiana significativa sobre *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina para as substâncias gutiferona -A, 7-epiclucianona e seu complexo metálico 7-epiclucianona-cobre (7-epi-Cu). Os mesmos autores avaliaram a segurança destes bioativos e verificaram que estes não apresentaram efeitos citotóxicos sobre células epiteliais da glândula mamária bovina (MAC-T), mostrando-se uma alternativa promissora para tratamento da mastite.

O estudo da caracterização dos perfis de resistência aos antimicrobianos de *B. cereus* isolados de leite de animais com mastite é importante pois há poucos trabalhos na literatura tais como Schiefer *et al.* (1976), Parkinson *et al.* (1999), Molina e Rivadeneira (2008).

Além disso, o número de bactérias de origem animal e/ou humana resistentes a antimicrobianos vem aumentando em proporções acima que a capacidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos. Assim, observa-se a importância da avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias extraídas de plantas que possam funcionar no tratamento ou mesmo como adjuvantes, aumentando as chances de sucesso do tratamento, além de contribuir com a diminuição da pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos nas três esferas da saúde Única.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os fatores de virulência, verificar a formação de biofilmes, avaliar o potencial

antimicrobiano de substâncias bioativas extraídas de plantas, verificando as associações com antimicrobianos convencionais frente a isolados de *B. cereus* resistentes a antimicrobianos, obtidos a partir de amostras de leite de bovinos com mastite.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dois *Bacillus cereus* (1 e 2) utilizados neste estudo, foram isolados de mastite bovina em uma propriedade leiteira de Campo Verde – Mato Grosso, identificados e tiveram o perfil de resistência determinado em estudo anterior, apresentando resistência à ampicilina, amoxicilina, sulfametoxazol + trimetoprima, cefalexina e ceftiofur (ALVES, 2022).

5.2.1 Detecção de fatores de virulência

A extração de DNA genômico dos isolados foi realizada com a utilização do kit Bio Gene Extração de gDNA - Quibasa® de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação foi preparada através da reação com volume total de 25 µL. Como controle positivo foi utilizada a linhagem de *B. cereus* ATCC 14579 e controle negativo H₂O free. As reações foram realizadas conforme descrito por Yang *et al.* (2005), Guinebretiere *et al.* (2006, 2010), Martinez-Blanch *et al.* (2009) e Lima (2019) apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Primers e reações para detecção de genes de virulência de *Bacillus cereus* isolados de mastite bovina.

| Genes (atividade) | Primers no sentido 5'-3' | Ciclos | Produto (pb) | Referências |
|---|--|---|--------------|---|
| hblA (Hemolisina) | ATTAATACAGGGGATGGAGAACTT TGATCCTAATACTTCTTCTAGACGCTT | 94°C/2 min, 30 ciclos: | 237 | Yang <i>et al.</i> (2005) |
| hblC (Hemolisina) | CCTATCAATACTCTCGCAACACCAAT TTTTCTTGATTGTCATAGCCATTTCT | 95°C/30s, 60°C/30s e 72°C/45s, 72°C/7 min | 386 | Yang <i>et al.</i> (2005) |
| hblD (Hemolisina) | AGATGCTACAAGACTTCAAAGGGAACTAT TGATTAGCACGATCTGCTTTCATACTT | 94°C/2 min, 30 ciclos: | 436 | Yang <i>et al.</i> (2005) |
| Nhe (Enterotoxina não hemolítica) | GTAATGCTGCVGATAGYCAAAC GGCATVATRTTYCCTGCTGC | 94°C/2 min, 30 ciclos: 95°C/30s, 60°C/30s e 72°C/45s, 72°C/7 min | 372 | Guinebretiere <i>et al.</i> (2010) |
| CytK 2 (Citotoxina K) | CAATCCCTGGCGCTAGTGCA GTGIAGCCTGGACGAAGTTGG | 94°C/5 min, 30 ciclos: 94°C/15s, 57°C/30s e 72°C/30s, 72°C/7 min | 585 | Guinebretiere <i>et al.</i> (2006). |
| clo (Cereulida O) | CTGTAGCGAATCGTACGTATC TACTGCTCCAGCCACATTAC | 94°C/5 min, 30 ciclos: 94°C/30s, 56°C/45s e 72°C/45s, 72°C/5 min | 185 | Martinez-Blanch <i>et al.</i> (2009) |
| plcr (regulador pleiotrópico) | CCCGATTCAATTCTGCTCAC TGCACGCAGAGAAATTAGGA | 94°C/2 min, 40 ciclos: 95°C/3s, 60°C/30s e 72°C/45s, 72°C/7 min | 118 | Lima (2019) |

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com GelRed®. Como padrão foi utilizado marcador de DNA de 100pb.

5.2.2 Preparo dos antimicrobianos

A solução de trabalho foi preparada no mesmo dia da utilização, sendo a concentração final de cada antimicrobiano foi 1mg/mL. Os antimicrobianos amoxicilinas, ampicilina, cefalexina e sulfametoxazol/trimetoprima foram diluídos em água estéril enquanto para a diluição do ceftiofur foi em água estéril + 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) – Synth®.

5.2.3 Preparo das substâncias bioativas

Foram utilizadas quatro substâncias bioativas: Mangiferina, β -cariofileno, 7-epiclusianona, gutiferona-A.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da adição de 500 μ L de solvente DMSO e 1mg de amostra liofilizada de cada substância bioativa, e posterior adição de 500 μ L de tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline* - PBS), obtendo-se a padronização da concentração final de 1mg/mL a 50% de DMSO. Já a concentração testada para o β -cariofileno foi de 400mg/mL, uma vez que estudos anteriores utilizaram concentrações maiores que 1mg/mL, como nos testes realizados por Almeida *et al.* (2020) em diferentes microrganismos.

5.2.4 Concentração Inibitória Mínima – CIM

Este teste foi realizado pelo método da microdiluição, em placa de polietileno de 96 poços. Os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos para a obtenção da CIM conforme CLSI M45 (2016). Para isso, a coluna 1 foi utilizada como controle positivo, recebendo 100 μ L de cultura de cada isolado (diluído a $1,0 \times 10^5$ UFC/mL), juntamente com 100 μ L de caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*). O controle negativo foi depositado na coluna 12, com a adição apenas de 200 μ L de caldo BHI. Cada poço entre as colunas 3 e 11 recebeu 100 μ L de PBS, enquanto na coluna 2 foi adicionado 200 μ L de antibiótico na concentração de 1mg/mL, seguindo das diluições seriadas com volume de 100 μ L em cada poço (2 ao 11) com posterior homogeneização, sendo os últimos 100 μ L pipetados dos poços da coluna 11 descartados.

As placas de microtitulação foram incubadas em estufa de crescimento bacteriano, a 37°C por 24h, e o crescimento dos isolados foi avaliado em um aparelho leitor de ELISA calibrado a 550_{nm} de comprimento de onda, e posteriormente com a utilização do corante resazurina para estimar a atividade antimicrobiana. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

5.2.5 Concentração Bactericida Mínima – CBM

Dos poços da placa de microtitulação utilizada para a determinação da CIM foram tomados 50µL e transferidos para uma nova placa, com auxílio de micropipeta. Cada poço da nova placa também recebeu 150µL de BHI. A placa foi incubada à 37°C por 24 horas. Após incubação, foi realizada leitura em aparelho leitor de ELISA a 550nm de comprimento de onda, e posteriormente acrescentando em cada poço 50µL de resazurina. Foi considerada a CBM a menor concentração onde não houve crescimento bacteriano.

5.2.6 Interações entre antimicrobianos e substâncias bioativas

Para a determinação da interação sinérgica, aditiva ou antagônica existente pela combinação de antimicrobianos tradicionais com as substâncias bioativas, foi utilizado o teste de sinergismo aplicando-se o método Checkerboard com adaptações (REUK-NGAM *et al.*, 2014). As concentrações das soluções foram ajustadas para 4x, 2x, 1x, 0,5x e 0,25x CIM. Cada teste foi montado em uma microplaca de polietileno estéril de 96 poços. Após a incubação a 37°C por 24 horas, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (D.O._{550nm}). Os testes de sinergismo foram realizados em triplicata.

Para classificar as interações foi usado o índice fracional de concentração inibitória (FIC), o qual foi calculado através da seguinte equação: $A/CIM_A + B/CIM_B = FIC_A + FIC_B = \text{Índice FIC}$. Onde A e B são as CIM de cada antibiótico em combinação (em um único poço), e CIM_A e CIM_B são as CIM de cada substância individualmente. O valor do índice FIC é então usado para categorizar a interação dos dois antibióticos testados. Quando $FIC < 0,5$ – sinergismo, $FIC > 4$ – antagonismo, FIC entre 0,5 e 4 - aditivo ou indiferente.

5.2.7 Produção de biofilmes

Os melhores resultados das associações, ou seja, associações sinérgicas, entre antimicrobianos e substâncias bioativas, foram usados para verificar a formação de biofilmes.

Foi utilizada a metodologia proposta por Stepanović *et al.* (2007) e Moreira *et*

al. (2012) com modificações. Um volume de 230µL de cultura diluída a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL de Tryptone Soya Broth (TSB) + glicose 1% de cada isolado, juntamente com 70µL de solução da associação substância bioativa com antimicrobianos, de acordo com as concentrações sinérgicas do checkerboard, sendo ajustas para 4x, 2x, 1x, 0,5x, 0,25x e 0,12x a concentração sinérgica para a combinação (antimicrobiano + substância bioativa) e para as substâncias bioativas isoladas as soluções foram ajustadas para 1x, 0,5x, 0,25x, 0,12x, 0,06x e 0,03x a CIM para cada substância. Para o controle positivo foi empregado 230µL de cultura, adicionada de 70µL de água destilada, e como controle negativo utilizou-se 230µL de caldo TSB + glicose 1%, adicionado de 70µL de solução antimicrobiana/ substância bioativa. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e cada isolado foi testado em triplicata. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado, e cada poço lavado três vezes com 250µl de água destilada. Posteriormente foram adicionados 250µL de metanol, aguardando 15 minutos e após o descarte e a secagem da placa a camada de biofilme aderente formada em cada poço foi corada com 250µL de cristal violeta a 2% por 10 minutos à temperatura ambiente. Logo após a placa foi enxaguada em água corrente até as lavagens eliminarem todo o excesso de corante. A placa foi seca à temperatura ambiente e adicionado 150µL de ácido acético a 33% por poço, em seguida tampada, aguardando 15 minutos. A leitura foi realizada utilizando um leitor de Elisa com absorvância à 550_{nm} onde foram mensurados os valores de densidade óptica (DO) e a média aritmética das triplicatas foi calculada e comparadas às médias do controle esterilidade (DOc), desta forma, os *B. cereus* foram classificados quanto a produção de biofilme em não produtor ($DO \leq DOc$), fraco produtor ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderado produtor ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e forte produtor de biofilmes ($4 \times DOc < DO$).

A formação de biofilmes nas diferentes concentrações de antimicrobianos/bioativos foi avaliada comparando-se a densidade óptica do tratamento ao controle positivo. Os resultados foram apresentados como a média das repetições. Para comparação estatística das medidas de absorvância segundo os grupos avaliados utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e, na presença de significância estatística, foi realizado também o teste post-hoc de Nemenyi para comparações pareadas com distribuição de Tukey para determinação do p-valor ajustado pelo método de Bonferroni visando identificar a localização da diferença estatística. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software R 4.1.2 considerando nível de

significância de 5% no teste bicaudal.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Fatores de virulência

Foi possível observar o mesmo perfil de virulência para os dois isolados de *B. cereus*, ao amplificarem os fragmentos de DNA na reação de PCR correspondente a hemolisina BL (*hbl*), gene *hblA*, gene *hblC*, gene *hblD*; além da citotoxina K (*CytK*), cereulida (*clo*) e regulador pleiotrópico (*plcr*). Mas esses isolados apresentaram resultados diferentes quanto aos testes de CIM, CBM, associações com antimicrobianos e formação de biofilme, sugerindo que possivelmente não se trata do mesmo isolado. Nenhum dos dois isolados amplificaram o gene que codifica a enterotoxina não hemolítica (*Nhe*).

A produção destas enterotoxinas por *B. cereus* possui grande relevância, pois são responsáveis por desencadear intoxicação alimentar, sendo descritos surtos em várias partes do mundo. A síndrome diarreica ocorre pela ação de três enterotoxinas termolábeis, tais como: Hemolisina BL, Enterotoxina não hemolítica e Citotoxina K. Enquanto a Cereulida está associada a sintomas de náuseas e vômitos (BEECHER; MACMILLAN, 1991; AGATA *et al.*, 1995; LUND; GRANUM, 1996; LUND *et al.*, 2000).

O ativador transcricional *plcr* permite a adaptação do *B. cereus* ao ambiente em que se encontra, possuindo grande importância na produção de biofilmes, além de controlar a produção de várias toxinas (enterotoxinas, hemolisinas) e enzimas (fosfolipases e proteases) (GOHAR *et al.*, 2008).

Owusu-Kwarteng *et al.* (2017) isolaram um total de 96 cepas de *B. cereus* de solos de pastagem de bovino e produtos lácteos, destes, 13% possuíam os três genes que codificam o complexo HBL de enterotoxina hemolítica (*hblA*, *hblC* e *hblD*), 25% demonstraram ausência dos genes HBL e 63% (60/96) dos isolados apresentavam pelo menos um dos três genes HBL, enquanto a presença do gene *cytk* foi correspondente a 75% dos isolados. No presente estudo, os dois isolados testados apresentaram quase todos os genes de fatores de virulência avaliados, exceto o gene de enterotoxina não hemolítica (*Nhe*). Comparando com o estudo de Owusu-Kwarteng *et al.* (2017), a porcentagem de genes de virulência nos dois isolados de *B. cereus* foi maior, este é um dado relevante não apenas para a saúde animal, mas também para

saúde pública, uma vez que o leite é um veículo de disseminação dessas toxinas como também do agente para humanos.

Lima (2019), demonstrou que a expressão dos genes *plcr*, *hblA*, *hblC*, *hblD*, *Cytk 2* por *B. cereus* persistiu ao longo de toda a *shelf-life*, após processo de pasteurização, sendo capaz de causar danos à saúde do consumidor além da formação de biofilmes. A presença de cepas de *B. cereus* codificadoras de enterotoxinas e resistentes aos antibióticos comumente utilizados, ressalta a grande importância do controle de qualidade durante o processamento do leite e seus derivados.

5.3.2 Determinação de Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

O isolado 2 apresentou as CIM e CBM maiores que aos valores encontrados para o isolado 1, exceto para amoxicilina e sulfametoxazol/trimetoprima. As concentrações inibitórias encontradas pelo teste (Tabela 6), foram elevadas; visto que as concentrações de 0.5µg/mL para ampicilina e 76/4µg/mL para Sulfametoxazol + Trimetoprima, correspondem à primeira faixa de resistência determinada pelo CLSI M45 (2016), enfatizando a resistência já apresentada pelo antibiograma.

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite frente a isolados de *Bacillus cereus*.

| Antimicrobianos | CIM e CBM | | | |
|-----------------------------|--------------------------|------------|--------------------------|------------|
| | <i>Bacillus cereus</i> 1 | | <i>Bacillus cereus</i> 2 | |
| | CIM (µg/mL) | CBM(µg/mL) | CIM(µg/mL) | CBM(µg/mL) |
| Amoxicilina | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Ampicilina | 31,25 | 31,25 | 250 | 250 |
| Cefalexina | 62,5 | 83,33 | 125 | 125 |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima | 250/13,2 | 500/26,4 | 250/13,2 | 500/26,4 |
| Ceftiofur | 62,5 | 67,7 | 125 | 250 |

Verificou-se que para atividade bactericida diante de *B. cereus* 1, necessitou de uma concentração maior que a CIM para a cefalexina, assim como apresentado também pelo sulfametoxazol/trimetoprima e ceftiofur, para ambos *B. cereus*.

ERICKSON *et al.* (2014), demonstrou a degradação do ceftiofur pela bactéria *B. cereus* P41 após hidrólise por β -lactamase, sendo capaz de crescer na presença

de ceftiofur em uma concentração maior que 100µg/mL, corroborando com o encontrado para o isolado 2 deste estudo. Behravan e Rangsaaz (2004) avaliaram a atividade de β-lactamases (penicilinase e cefalosporinase) presente em *B. cereus* e observaram uma relação entre sua atividade máxima com temperatura e pH ideais.

No caso das substâncias bioativas verifica-se o mesmo comportamento anterior, o isolado 2 apresentando a CIM e a CBM maior que o isolado 1 (Tabela 7). A concentração máxima que possibilitava uma diluição adequada dos bioativos foi de 1mg/mL para os bioativos 7- epiclusianona (7-epi), gutiferona-A (gut-A) e mangiferina, e dentro da faixa testada (diluição seriada), não foi possível determinar o CIM e CBM exatos para mangiferina.

Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de substâncias extraídas de plantas frente *Bacillus cereus* isolados de mastite bovina.

| Bioativo | CIM e CBM | | | |
|-----------------|--------------------------|-----------|--------------------------|------------|
| | <i>Bacillus cereus</i> 1 | | <i>Bacillus cereus</i> 2 | |
| | CIM | CBM | CIM | CBM |
| 7-Epiclusianona | 1,95µg/mL | 1,95µg/mL | 3,9µg/mL | 3,9µg/mL |
| Gutiferona-A | 7,81µg/mL | 7,8µg/mL | 15,62µg/mL | 15,62µg/mL |
| β- cariofileno | 50mg/mL | 50mg/mL | 50mg/mL | 50mg/mL |
| Mangiferina | ≥500µg/mL | ≥500µg/mL | ≥500µg/mL | ≥500µg/mL |

Dentre as substâncias bioativas utilizadas nesta pesquisa, gut-A e 7-epi apresentaram os melhores resultados como antimicrobianos contra *B. cereus*. Segundo Cos *et al.* (2006), valores de CIM abaixo de 25µg/mL para compostos isolados de plantas podem ser considerados relevantes. Também foi observada ação bactericida sobre *B. cereus* na presença de 7-epi e gut-A, conforme Hafidh *et al.* (2011), quando a CBM for igual a CIM a substância pode ser considerada bactericida.

Pesquisas com extratos da mangueira, possuindo a mangiferina como composto majoritário, demonstraram a inibição do crescimento de bactérias gram positivas e negativas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (RAJU *et al.*, 2019; CARRILLOTÓMALA *et al.*, 2020). Atividade antimicrobiana também foi demonstrada para óleo-resina de copaíba, especialmente o β-cariofileno; para *S. aureus*, *S. epidermidis*; e *Staphylococcus* coagulase-positiva multirresistentes (ZIECH *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2020). Diferente destes estudos, a mangiferina e o β-cariofileno não apresentaram bons resultados como antimicrobianos para os isolados de *B. cereus* testados, visto que os resultados da CIM para as duas

substâncias foram maiores que 25µg/mL.

A atividade antimicrobiana das substâncias bioativas 7-epi e gut-A contra e *B. cereus* ATCC 11778, foram avaliadas anteriormente por Naldoni *et al.* (2009) com valores de CIM para 7-epi, 0,6µg/mL e gut-A 2,4µg/mL. Assim como no presente estudo a CIM para gut-A foi maior que para 7-epi. Tal fato estaria ocorrendo devido a relação entre lipofilicidade da molécula e atividade antimicrobiana mais acentuada para bactérias gram-positivas (NALDONI *et al.*, 2009).

A inibição da multiplicação de *B. cereus* isolados de mastite bovina é um dado importante sobre a ação antimicrobiana da gut-A e da 7-epi, apresentando a relevância da utilização destas substâncias na terapia da mastite causada por estes patógenos. Valores de CIM relativamente baixos também foram descritos anteriormente para *Streptococcus* spp., *S. uberis* e *S. agalactiae* isolados de mastite bovina (BARROS *et al.*, 2017; MAIA *et al.*, 2018).

Este é o primeiro trabalho para verificar a atividade antimicrobiana destas substâncias bioativas sobre *B. cereus* isolados de mastite bovina. São isolados de campo sujeitos a quaisquer variações e pressões do ambiente (medicamento, calor, frio entre outras).

Na tabela 8, encontram-se as médias das leituras das absorbâncias realizadas em triplicata para a determinação da CIM da gutiferona-A e 7-epiclusianona para cada isolado. As figuras referentes as densidades ópticas encontram-se no Material Suplementar 2.

Tabela 8 - Médias das absorbâncias (D.O), obtidas por testes realizados em triplicatas, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da gutiferona-A (gut-A) e 7-epiclusianona (7-epi) de *Bacillus cereus* 1 e 2 isolados de mastite bovina.

| | | Concentrações (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| ISOLADO | | C+ | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,62 | 7,81 | 3,90 | 1,95 | 0,97 | C- |
| MÉDIA gut-A | <i>Bacillus cereus</i> 1 | 0,703 | 0,168 | 0,122 | 0,090 | 0,072 | 0,068 | 0,067 | *0,063 | 0,467 | 0,479 | 0,468 | 0,078 |
| | <i>Bacillus cereus</i> 2 | 0,676 | 0,129 | 0,115 | 0,089 | 0,073 | 0,070 | *0,068 | 0,474 | 0,442 | 0,469 | 0,539 | 0,078 |
| | | C+ | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,62 | 7,81 | 3,90 | 1,95 | 0,97 | C- |
| MÉDIA 7-epi | <i>Bacillus cereus</i> 1 | 0,722 | 0,309 | 0,229 | 0,125 | 0,069 | 0,058 | 0,057 | 0,055 | 0,075 | *0,157 | 0,304 | 0,078 |
| | <i>Bacillus cereus</i> 2 | 0,658 | 0,319 | 0,223 | 0,128 | 0,073 | 0,059 | 0,058 | 0,069 | *0,109 | 0,438 | 0,538 | 0,074 |

C+: poço sem antimicrobiano - apenas bactéria; C-: poço sem bactéria apenas BHI. *Valores de absorbância referentes a CIM média de cada substância bioativa.

5.3.3 Interações entre antimicrobianos e substâncias bioativas

Os valores do índice de concentração inibitória fracionária (FIC), demonstram que os bioativos 7-epi e gut-A exibem um sinergismo quando associado aos antimicrobianos ampicilina e amoxicilina (Tabela 9). As CIMs comparadas às concentrações do checkerboard para os antimicrobianos convencionais e substâncias bioativas encontram-se no Material Suplementar 3.

Tabela 9 - Interações de antimicrobianos com substâncias bioativas sob *Bacillus cereus* isolados de mastite bovina.

| Antimicrobianos + Bioativo | <i>Bacillus cereus</i> | |
|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Isolado 1 | Isolado 2 |
| Ampicilina | | |
| Ampicilina + 7-epi | 0,31 (sinergismo) | 0,25 (sinergismo) |
| Ampicilina + gut-A | 0,49 (sinergismo) | 0,28 (sinergismo) |
| Amoxicilina | | |
| Amoxicilina + 7-epi | 0,26 (sinergismo) | 0,18 (sinergismo) |
| Amoxicilina + gut-A | 0,18 (sinergismo) | 0,25 (sinergismo) |
| Ceftiofur | | |
| Ceftiofur + 7-epi | 0,49 (sinergismo) | 2,25 (indiferente/aditivo) |
| Ceftiofur + gut-A | 0,62 (indiferente/aditivo) | 0,56 (indiferente/aditivo) |
| Cefalexina | | |
| Cefalexina + 7-epi | 2,00 (indiferente/aditivo) | 4,00 (antagônico) |
| Cefalexina + gut-A | 0,748 (indiferente/aditivo) | 3,00 (indiferente/aditivo) |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima | | |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima + 7-epi | 3,00 (indiferente/aditivo) | 2,5 (indiferente/aditivo) |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima + gut-A | 1,49 (indiferente/aditivo) | 1,5 (indiferente/aditivo) |

7-epiclusianona (7-epi), gutiferona-A (gut-A).

Classificação da associação pelo índice de concentração inibitória fracionária (FIC): FIC <0,5 – sinergismo, FIC > 4 – antagonismo, FIC entre 0,5 e 4 - aditivo ou indiferente.

Este ensaio permite analisar o efeito de combinações de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação distintos no crescimento bacteriano. A partir do FIC é possível a avaliação da interação entre as substâncias estudadas, valores $\leq 0,5$ indicam uma interação sinérgica, sendo que o grau de sinergismo aumenta quando o valor tende para zero (JACKSON *et al.*, 2009).

Segundo Rani *et al.* (2009), pode ser considerado sinergismo quando a associação de dois compostos diferentes resulta no aumento da atividade individual,

possibilitando diminuição da dose. Já a diminuição do seu efeito antimicrobiano é classificada como antagonismo, enquanto um efeito não antagonístico, menor que o sinergismo é designado indiferente ou aditivo.

A terapia de combinação pode ser utilizada para expandir o espectro antimicrobiano, com o objetivo de evitar o surgimento de organismos resistentes, minimizar a toxicidade, e para se obter a atividade antimicrobiana sinérgica (KUMAR *et al.*, 2012). Em estudo anterior, Maia *et al.* (2018), encontrou resultados de sinergismo significativos entre os β -lactâmicos, a 7-epi e gut-A; sendo que a simulação de docking molecular apresentou interações entre β -lactamase e estas duas substâncias bioativas. Os autores acima concluíram que a ligação inibitória dessas substâncias com a β -lactamase poderia justificar a reversão da resistência de *S. agalactiae* e *S. uberis* aos β -lactâmicos.

Já as associações entre as substâncias bioativas e os antimicrobianos cefalexina, ceftiofur e sulfametoxazol/trimetoprima não foram sinérgicas, uma vez que não possibilitaram redução da dose do antimicrobiano ou substância bioativa.

5.3.4 Produção de Biofilme por *Bacillus cereus*

Testes de sensibilidade a antimicrobianos, como a CIM não são suficientes para definir o sucesso terapêutico, por serem realizados com bactérias em crescimento planctônico, sendo que o estado sésil de microrganismos em biofilmes é significativamente mais resistente. Bactérias em biofilmes muitas vezes não são eliminadas por concentrações terapêuticas de antimicrobianos, mas a associação de antimicrobianos sinérgicos poderá ser mais eficiente para evitar a formação de biofilmes (CIOFU *et al.*, 2017). Desta forma, neste estudo, foi avaliada a atividade sinérgica de antimicrobianos em combinação com substâncias bioativas e a influência desta associação na formação de biofilme por *B. cereus*.

Na ausência de antimicrobianos e substâncias bioativas, observou-se que o isolado 1 não é um produtor de biofilmes, enquanto o isolado 2 é um moderado produtor (Tabela 10).

Tabela 10 - Médias de densidade óptica e classificação do potencial de formação de biofilme por isolados de *Bacillus cereus* obtidos de mastite bovina.

| Bactérias | DO | DO _c | Classificação |
|-----------|---------|-----------------|-------------------|
| isolado 1 | 0,03682 | 0,03882 | Não produtor |
| isolado 2 | 0,06244 | 0,02433 | Moderado produtor |

DO_c = controle esterilidade.

Classificação quanto a indução de biofilmes: não produtor ($DO \leq DO_c$), fraco produtor ($DO_c < DO \leq 2 \times DO_c$), moderado produtor ($2 \times DO_c < DO \leq 4 \times DO_c$) e forte produtor de biofilmes ($4 \times DO_c < DO$).

A formação de biofilme favorece a permanência do patógeno no úbere, além de aumentar a resistência aos antibióticos convencionais, contribuindo para infecções por mastites recorrentes, acarretando alterações nos componentes do leite (GOMES *et al.*, 2016).

Estudo realizado por Pasvolsky *et al.* (2014) verificaram que todas as espécies de *Bacillus* testados, *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. licheniformis*, foram produtores de biofilme, constituindo um problema por formarem biofilmes dentro de ductos de ordenha e em superfícies de equipamentos na indústria de laticínio. Estudos apontam a necessidade da adoção de estratégias de higienização eficientes pelas indústrias de laticínios para remoção de biofilmes, e que alguns desinfetantes comumente utilizados podem apresentar resultados insatisfatórios para execução de tal processo (SILVA *et al.*, 2018).

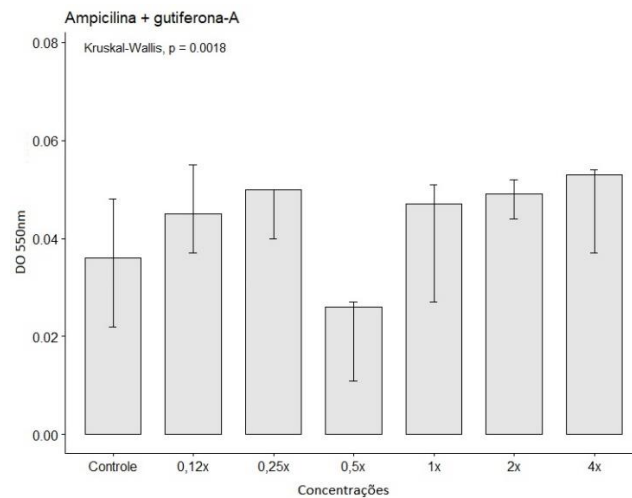
B. cereus 1 além de não formar biofilme, apresentou CIMs menores para os antimicrobianos Ampicilina, Cefalexina e Ceftiofur; e para as substâncias bioativas 7-Epiclusianona e Gutiferona-A, quando comparado com o isolado 2 (Tabelas 6 e 7); necessitando de concentrações maiores dos compostos terapêuticos para eliminá-los, embora, os dois isolados apresentem os mesmos fatores de virulência.

Um estudo realizado por Hsueh *et al.* (2007), revelou que a formação de biofilme por *B. cereus* está relacionada à produção de um biossurfactante, também responsável por inibir o crescimento de várias bactérias gram-positivas, facilitando a colonização por *B. cereus*. No presente trabalho verificou-se a não produção de biofilmes por um dos isolados assim, infere-se que este isolado também tenha produção insuficiente de biossurfactante, embora não tenha sido realizado este tipo de teste.

O isolado 1 de *B. cereus*, frente a associação entre ampicilina e gutiferona-A (Figura 3), demonstrou uma menor produção de biofilme na concentração de 0,5x, ajustada à concentração sinérgica apontada pelo teste de checkerboard, quando

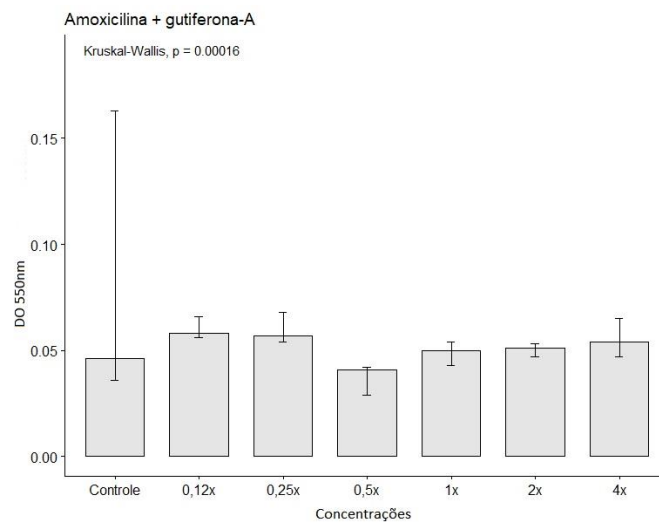
comparado às concentrações de 0,12x ($p=0,001$) e 0,25x ($p=0,007$). Já a associação da amoxicilina com gutiferona-A (Figura 2), resultou em diferença entre 0,5x a concentração sinérgica em relação à 0,12x ($p=0,001$) e 0,25x ($p=0,0002$). Estas poderiam representar as concentrações mais adequadas com base nos resultados de biofilmes e associações entre antimicrobianos e substâncias bioativas para o *B. cereus* 1.

Figura 3 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 1 com associação de ampicilina e gutiferona-A.



x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (ampicilina 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + gutiferona-A 1,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

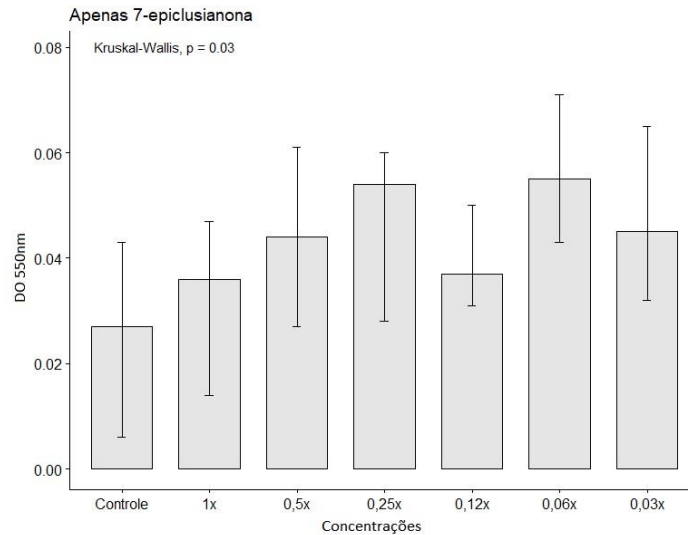
Figura 4 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 1 com associação de amoxicilina e gutiferona-A.



x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (amoxicilina 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + gutiferona-A 0,97 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para a 7-epiclusianona separadamente (Figura 5) as diferenças significativas foram entre 0,25x a concentração sinérgica e o controle ($p=0,027$), indicando a indução da produção de biofilme quando comparada ao controle.

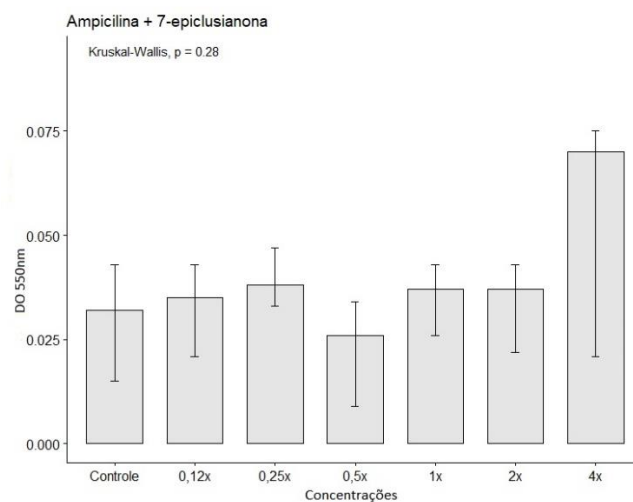
Figura 5 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 1 na presença de 7-epiclusianona.



x = multiplicação pela concentração inibitória mínima de 7-epiclusianona ($1,95\mu\text{g/mL}$).

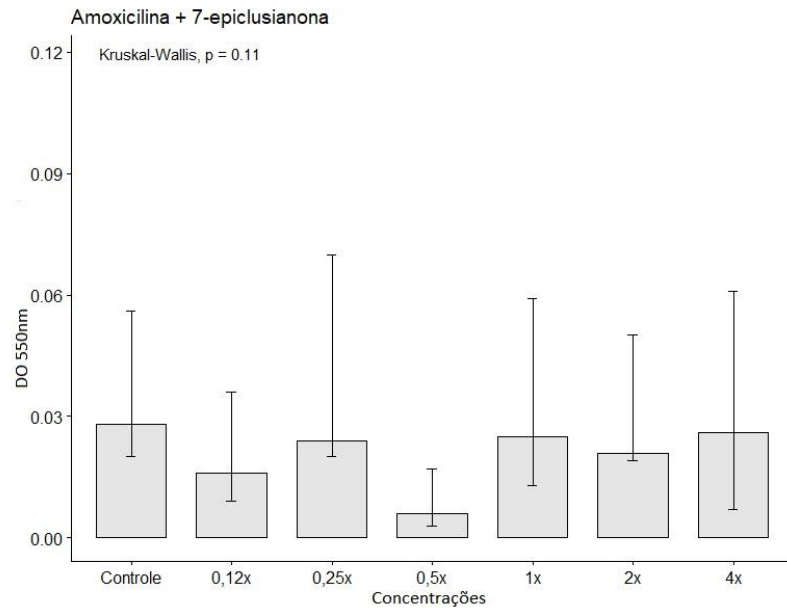
As demais associações (Figura 6, 7 e 8) e a gutiferona-A separadamente (Figura 9) não estabeleceram diferenças significativas quanto a produção de biofilme.

Figura 6 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 1 com associação de ampicilina e 7-epiclusianona.



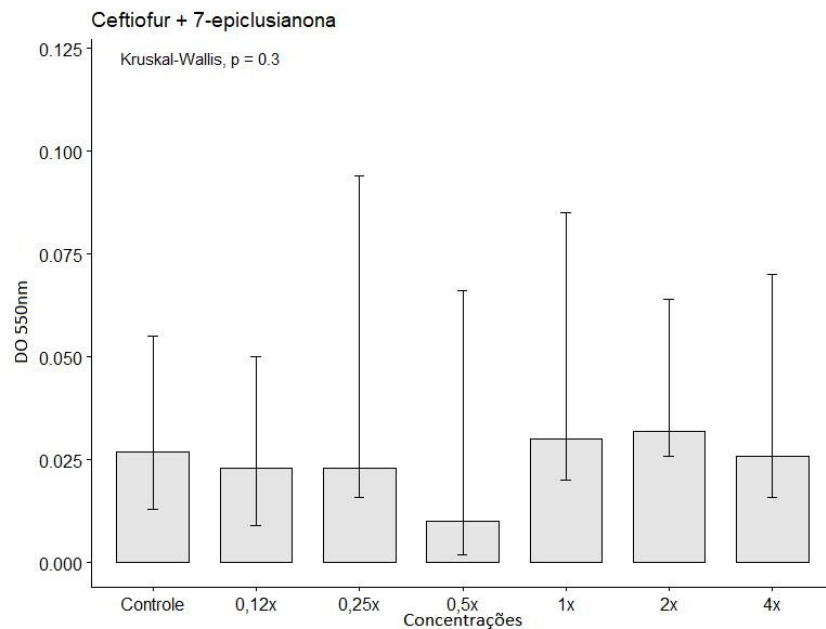
x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (ampicilina $31,25\mu\text{g/mL}$ + 7-epiclusianona $0,48\mu\text{g/mL}$).

Figura 7 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 1 com associação de amoxicilina e 7-epiclusianona.



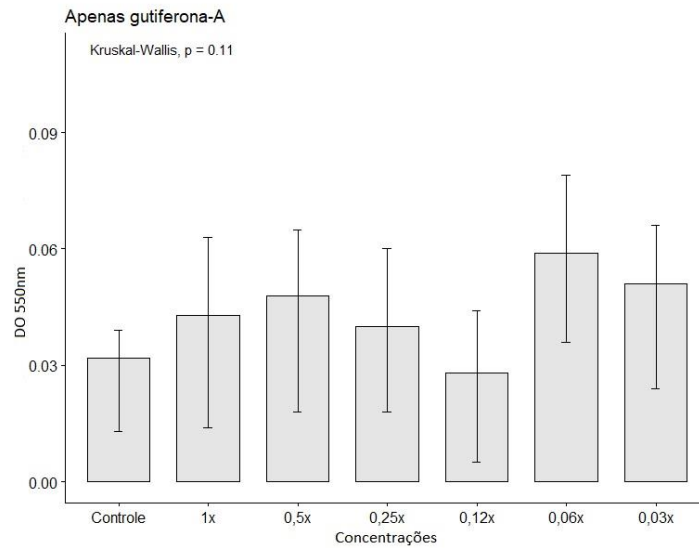
x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (amoxicilina $7,81\mu\text{g/mL}$ + 7-epiclusianona $0,48\mu\text{g/mL}$).

Figura 8 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 1 com associação de ceftiofur e 7-epiclusianona.



x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (ceftiofur $15,62\mu\text{g/mL}$ + 7-epiclusianona $0,48\mu\text{g/mL}$).

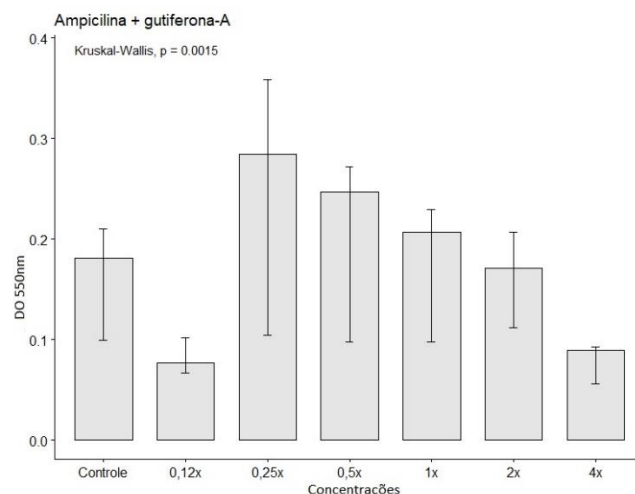
Figura 9 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 1 na presença de gutiferona-A.



x = multiplicação pela concentração inibitória mínima de gutiferona-A (7,81µg/mL).

Quanto ao isolado 2 de *B. cereus*, foi possível observar que a ampicilina com gutiferona-A (Figura 10), resultou em diferença estatística na produção de biofilme entre 0,25x e 0,12x ($p=0,009$) e limítrofe entre 0,5x e 0,12x ($p=0,051$), ou seja, a mediana de 0,12x foi estatisticamente inferior em relação as medianas de 0,25x e 0,5x a concentração sinérgica, indicando que algumas concentrações podem aumentar a produção de biofilme por este isolado.

Figura 10 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 2 com associação de ampicilina e gutiferona-A.

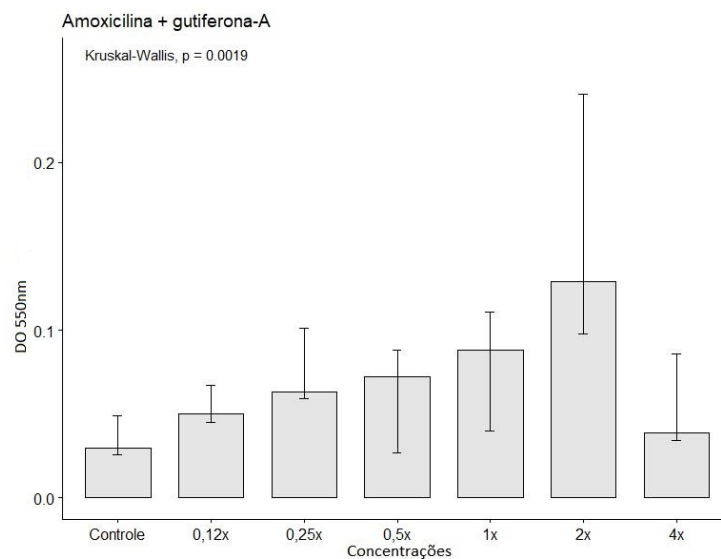


x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (ampicilina 7,81µg/mL + gutiferona-A 3,90µg/mL).

Trabalhos anteriores evidenciaram que baixas concentrações de antimicrobianos como enrofloxacina, β -lactâmicos (ampicilina e amoxicilina) e polimixina, aumenta a formação de biofilmes por bactérias como *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Acinetobacter baumannii* (MOREIRA *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2014; SATO *et al.*, 2018). Enquanto outros verificaram que concentrações subinibitórias de alguns antimicrobianos inibi a formação de biofilmes (WOJNICKS, 2013; OTANI *et al.*, 2018). Os resultados aqui apresentados mostram efeitos distintos na formação de biofilme para os dois isolados de *B. cereus*.

A amoxicilina quando associada a gutiferona-A (Figura 11), apresentou diferença entre 2x a concentração sinérgica e controle ($p=0,0003$), e, também entre 2x e 4x ($p=0,047$) ou seja, a amoxicilina com gutiferona-A aumentou a formação de biofilme por este isolado, e em maior proporção em algumas concentrações do teste como 2x a concentração sinérgica no checkerboard.

Figura 11 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 2 com associação de amoxicilina e gutiferona-A.

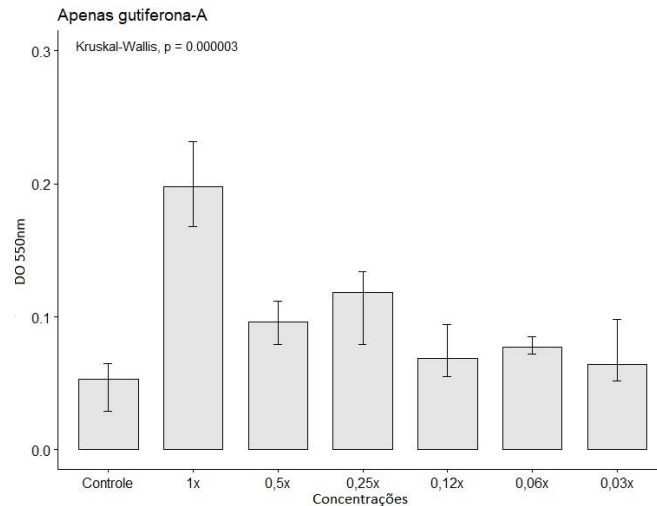


x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkerboard (amoxicilina 1,95 μ g/mL + gutiferona-A 3,90 μ g/mL).

A gutiferona-A (Figura 12), quando sozinha apresentou aumento na produção de biofilme na concentração 0,25x a concentração do CIM em relação ao controle ($p=0,016$), na concentração 1x versus controle ($p<0,001$), entre 1x versus 0,03x ($p=0,0005$), entre 1x versus 0,06x ($p=0,022$) e entre 1x versus 0,12x ($p=0,001$), nenhum grupo apresentou mediana estatisticamente inferior ao grupo controle, ou

seja, a gutiferona-A aumentou a produção de biofilme pelo *B. cereus* 2 em todas as concentrações testadas.

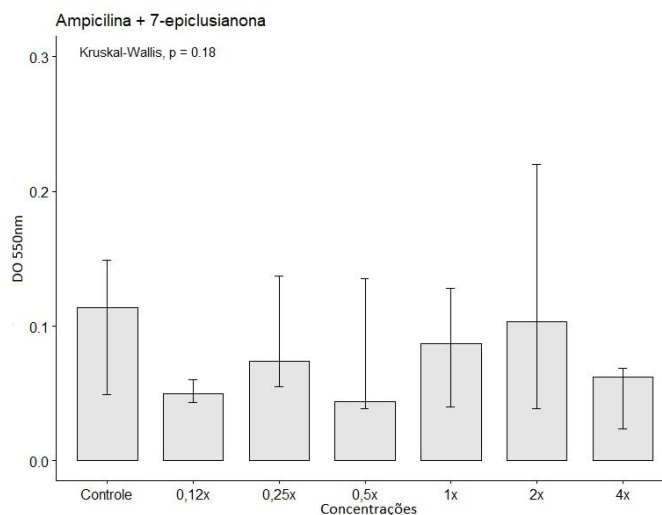
Figura 12 -Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 2 na presença de gutiferona-A.



x = multiplicação pela concentração inibitória mínima de gutiferona-A (15,62µg/mL).

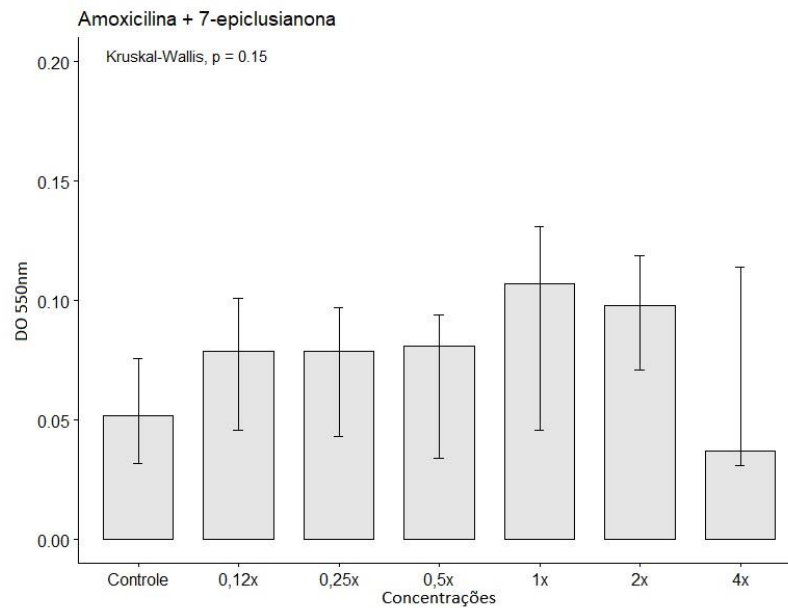
Não houve diferença significativa na produção de biofilme pelo *B. cereus* 2 quando na presença de ampicilina com 7-epiclusianona (Figura 13), amoxicilina com 7-epiclusianona (Figura 14) e 7-epiclusianona separadamente (Figura 15).

Figura 13 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 2 com associação de ampicilina e 7-epiclusianona.



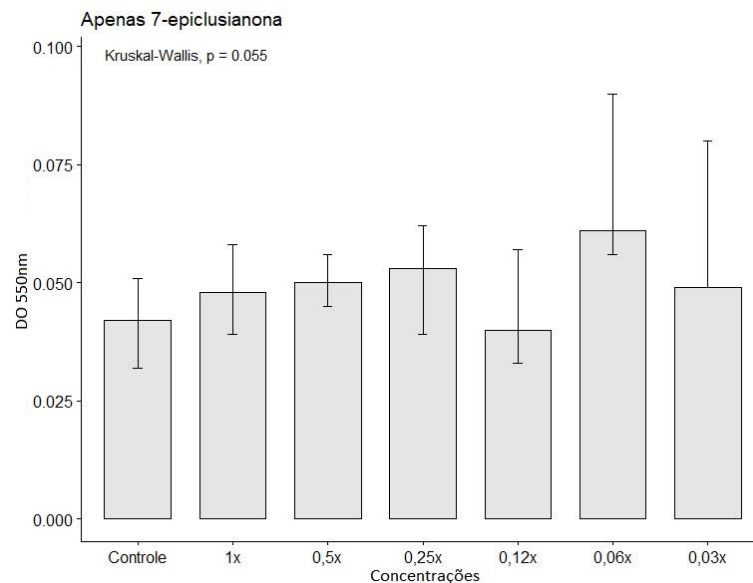
x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (ampicilina 7,81µg/mL + 7-epiclusianona 0,12µg/mL).

Figura 14 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 2 com associação de amoxicilina e 7-epiclusianona.



x = multiplicação pela concentração da associação sinérgica determinada pelo teste de checkboard (amoxicilina 31,25 µg/mL + 7-epiclusianona 0,48 µg/mL).

Figura 15 - Avaliação da formação de biofilme por *B. cereus* 2 na presença de 7-epiclusianona.



x = multiplicação pela concentração inibitória mínima de 7-epiclusianona (3,9µg/mL).

Concentrações de antimicrobianos necessárias para a inibição dos biofilmes bacterianos podem ser muito maiores que as concentrações suficientes para matar uma célula planctônica, bactérias em biofilmes são capazes de reduzir sua susceptibilidade aos antimicrobianos (DONLAN, 2001). Este fato pôde ser observado no presente estudo, aonde as concentrações efetivas no CIM e sinergismo para

alguns antimicrobianos e substâncias bioativas não foram capazes de reduzir a formação de biofilme.

Associada à ampicilina, a substância bioativa gutiferona-A, apresentou os melhores resultados quanto à redução na formação de biofilme pelos *B. cereus* 1 e 2, indicando que esta poderia ser a melhor opção de associação entre estas substâncias bioativas e antimicrobianos convencionais para os isolados de *B. cereus* testados neste estudo.

Ao avaliar a atividade antimicrobiana da curcumina, Viera (2019) aponta que a presença do grupo hidroxila ligado ao anel aromático estaria promovendo o aumento desta atividade. Apesar da presença de hidroxila fenólica na molécula da gutiferona-A, não seria possível definir precisamente a sua ação sobre a formação de biofilme por *B. cereus*.

Embora o presente trabalho não tenha avaliado a citotoxicidade das substâncias bioativas testadas, em um trabalho anterior, realizado por Maia *et al.* (2018) no mesmo laboratório que o presente estudo, foi observado que a 7-epiclusianona não causa efeito citotóxico em células de glândula mamária (MAC-T) em concentrações menores que 3,90 µg/mL, enquanto a gutiferona-A é capaz de causar toxicidade em concentrações maiores que 15,62 µg/mL. Uma vez que as concentrações ideais para os bioativos 7-epi e gut-A, apontadas pelo presente estudo, foram menores que as concentrações citotóxicas descritas por Maia *et al.* (2018), estes poderão ser alternativas viáveis como proposta terapêutica associados a antimicrobianos convencionais.

Antimicrobianos que possam estar obsoletos ou com baixa eficácia terapêutica, pouco indicados (como alguns β-lactâmicos testados nesta pesquisa), poderiam ser recuperados e reinseridos como opção terapêutica em combinações com substâncias bioativas, superando infecções bacterianas multirresistentes, além de reduzir as chances de pressão seletiva. Maia *et al.* (2018), observou a reversão de resistência aos antimicrobianos, ampicilina e gentamicina, quando associados à gutiferona-A ou à 7-epiclusianona sobre *S. agalactiae* e *S. uberis* isolados de mastite bovina.

5.4 CONCLUSÃO

Os isolados de *B. cereus* resistentes a antimicrobianos e obtidos de mastite bovina apresentaram em seus perfis de virulência, genes de toxinas responsáveis por diferentes síndromes, enfatizando a importância desta bactéria como problema relacionado à saúde humana, animal e ambiental.

As substâncias bioativas 7-Epiclusianona e a Gutiferona-A apresentaram efeito antimicrobiano sobre os isolados de *B. cereus*, observando redução da formação de biofilme pela associação da Gutiferona-A com ampicilina. A associação sinérgica com os antimicrobianos Beta-lactâmicos demonstra que estas substâncias bioativas são potenciais candidatas como recurso terapêutico para mastite bovina, significando uma alternativa promissora e viável para reduzir as chances de resistência a antimicrobianos, além de ampliar as possibilidades de êxito da terapia.

REFERÊNCIAS

- AGATA, N. et al. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS microbiology letters**, v. 129, n. 1, p. 17-19, 1995.
- AGUILAR-ÁVILA, D. S. et al. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, attenuates neuropathic pain and depressive-like behavior in experimental diabetic mice. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 5, p. 460-468, 2019.
- ALBERTI, T. B. et al. (-)- β -Caryophyllene, a CB2 receptor-selective phytocannabinoid, suppresses motor paralysis and neuroinflammation in a murine model of multiple sclerosis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, p. 691, 2017.
- ALMEIDA, J. E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) da oleoresina de copaíba. **Revista Uningá**, v. 57, n. 2, p. 12-22, 2020.
- ASH, C. et al. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 343-346, 1991.
- AVASHIA, S. B. et al. Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* containing *Bacillus anthracis* toxin genes. **Clinical infectious diseases**, v. 44, n. 3, p. 414-416, 2007.
- BARROS, M. et al. Antibacterial Activity of 7-Epiclusianone and Its Novel Copper Metal Complex on *Streptococcus* spp. Isolated from Bovine Mastitis and Their Cytotoxicity in MAC-T Cells. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 823, 2017.
- BASHA, R. H.; SANKARANARAYANAN, C. β -Caryophyllene, a natural sesquiterpene, modulates carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Acta histochemica**, v. 116, n. 8, p. 1469-1479, 2014.
- BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and immunity**, v. 59, n. 5, p. 1778-1784, 1991.
- BEHRAVAN, J.; RANGSAAZ, Z. Detection and Characterization of β -Lactam Resistance in *Bacillus cereus* PTCC 1015. **The Scientific World Journal**, v. 4, p. 622-627, 2004.
- BETTANIN, J. et al. Frequência de Isolamentos dos Agentes Etiológicos da Mastite Bovina no Sudoeste Paranaense. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.13, n.4, p. 440-451, 2019.
- BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Listas de padrões microbiológicos para alimentos.**

Brasília, DF: ANVISA, 2019. (Instrução Normativa, 60). Disponível: <www.anvisa.gov.br/legis/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de.pdf>. Acesso em: 05 abr. 2022.

BRUNTON, L. L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13**. Porto Alegre: Artmed, 2018.

CARRILLO-TOMALÁ, C.; DÍAZ-TORRES, R. Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de hojas de dos variedades de *Mangifera indica* L. **Revista Ciencia UNEMI**, v. 13, n. 32, p. 69-77, 2020.

CHAVES, J. Q. et al. Molecular Characterization and Risk Assessment of *Bacillus cereus* Sensu Lato Isolated from Ultrahigh-Temperature and Pasteurized Milk Marketed in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 80, p. 1060-1065, 2017.

CIOFU, O. et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. **Apmis**, v. 125, n. 4, p. 304-319, 2017.

CLSI. **M45: Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**. Marvern, PA: CLSI, 15 Aug. 2016.

CORRÊA, C. S. S. **Nanoprópolis no tratamento da mastite subclínica bovina: avaliação in vivo da eficácia via intramamária durante o período de lactação**. 2018, 90 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

DAHAM, S. S. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical infectious diseases**, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, 2001.

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.

ERICKSON, B. D. et al. A metallo- β -lactamase is responsible for the degradation of ceftiofur by the bovine intestinal bacterium *Bacillus cereus* P41. **Veterinary microbiology**, v. 172, n. 3-4, p. 499-504, 2014.

GOHAR, M. et al. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. **PLoS one**, v. 3, n. 7, p. e2793, 2008.

GOMES, F. et al. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 3, p. ftw006, 2016.

- GOREN, A. C. et al. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 448-453, 2011.
- GUINEBRETIERE, M. H. et al. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3388-3391, 2010.
- GUINEBRETIERE, M. H. et al. Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. **FEMS microbiology letters**, v. 259, n. 1, p. 74-80, 2006.
- HAFIDH, R. R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The open microbiology journal**, v. 5, p. 96, 2011.
- HOFFMASTER, A. R. et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 22, p. 8449-8454, 2004.
- HSUEH, Y.H. et al. Biosurfactant production and surface translocation are regulated by PlcR in *Bacillus cereus* ATCC 14579 under low-nutrient conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7225-7231, 2007.
- JACKSON, C. et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.
- JAY, J. M. et al. *Bacillus cereus* gastroenteritis, Morden Food Microbiology, & TH ED. **Springer Science Business Media**, Ney York, USA, p. 583-590, 2005.
- KUMAR, S.N. et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3143-3150, 2012.
- LIMA, J. A. S. **Análise da expressão gênica de *Bacillus cereus* s.s. em leite contaminado experimentalmente e pasteurizado ao longo da shelf-life.** Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, 2019.
- LUND, T. et al. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, 2000.
- LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS microbiology letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, 1996.
- MAIA, N. L. et al. Synergism of plant compound with traditional antimicrobials against *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1203, 2018.
- MANICKAM, N. et al. Neonatal meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus*. **The**

Pediatric infectious disease journal, v. 27, n. 9, p. 843-846, 2008.

MARTÍNEZ-BLANCH, J. F. et al. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **International journal of food microbiology**, v. 135, n. 1, p. 15-21, 2009.

MOLINA, V.; RIVADENEIRA, A. **Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha**. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas, 2008. p. 34-49.

MOREIRA, M. A. et al. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin. **Veterinary microbiology**, v. 160, n. 3-4, p. 488-490, 2012.

NA, S. et al. Enhancing the antimicrobial activity of ginseng against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* by heat treatment. **Food science and biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 203-210, 2018.

NALDONI, F. J. et al. Antimicrobial activity of benzophenones and extracts from the fruits of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of medicinal food**, v. 12, n. 2, p. 403-407, 2009.

ODA, M. et al. Role of Sphingomyelinase in the Pathogenesis of *Bacillus cereus* Infection. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 250-253, 2020.

OTANI, S. et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 24, n. 6, p. 428-433, 2018.

OWUSU-KWARTENG, J. et al. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

PAIVA, E. P. de et al. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. **Higiene Alimentar**, p. 87-92, 2009.

PAN, J. et al. Bioactive phenolics from mango leaves (*Mangifera indica* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 400-406, 2018.

PARKINSON, T. J. et al. A case of bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 47, p. 151-152, 1999.

PASVOLSKY, R. et al. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. **International journal of food microbiology**, v. 181, p. 19-27, 2014.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.

POMERANTSEV, A. P. et al. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6591-6606, 2003.

RADOSTITS, O. M. et al. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RAJU, N. V. et al. In-vitro studies on antitumour and antimicrobial activities of Methanolic kernel extract of *Mangifera indica* L. cultivar Banganapalli. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 12, n. 1, p. 357-362, 2019.

RANI, A. et al. Synergistic interaction between synthetic and natural products: a promising tool for the development of environmentally safe potent antimicrobial agents. **World Appl Sci J.**, v. 5, n. Special Issue for Environment, p. 59-63, 2009.

REUK-NGAM, N. et al. Antimicrobial activity of coronarin D and its synergistic potential with antibiotics. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SALAMITOU, S. et al. The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology**, v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.

SANTOS, E. L. et al. Enhanced antibacterial effect of antibiotics by the essential oil of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. and its major constituent beta-caryophyllene. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 4, p. 100100, 2021.

SANTOS, M. H. et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, p. 654-660, 1999.

SASAHARA, T. et al. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 2, p. 219-226, 2011.

SATO, Y. et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194556, 2018.

SCHIEFER, B. et al. Pathology of *Bacillus cereus* mastitis in dairy cows. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 17, n. 9, p. 239 - 243, 1976.

SELESTINO NETA, M. C. et al. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 190-197, 2017.

SILVA, H. O. et al. Efficiency of different disinfectants on *Bacillus cereus sensu stricto* biofilms on stainless-steel surfaces in contact with milk. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2934, 2018.

STENFORS ARNESEN, L. P. et al. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 579-606, 2008.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

VIEIRA, T. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de curcuminoides e estudo de suas reações de fragmentação em fase gasosa por espectrometria de massas sequencial**. 2019. Tese (doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2019.

WOJNICZ, D.; TICHACZEK-GOSKA, D. Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 259-265, 2013.

WU, S. et al. Beta-lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable *Haemophilus influenzae* by up-regulating carbohydrate metabolism. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e99204, 2014.

YAMADA, K. et al. Successful management of a *Bacillus cereus* catheter-related bloodstream infection outbreak in the pediatric ward of our facility. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, n. 11, p. 873-879, 2019.

YANG, I.-C. et al. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. **Journal of food protection**, v. 68, n. 10, p. 2123-2130, 2005.

ZHANG, Q.; YUE, L. Inhibitory activity of mangiferin on *Helicobacter pylori* induced inflammation in human gastric carcinoma AGS cells. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 14, n. 1, p. 263–271, 2016.

ZIECH, R. E. et al. Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 909-913, 2013.

MATERIAL SUPLEMENTAR II

Figura 16 - Multiplicação de *B. cereus* 1 e *B. cereus* 2 isolados de mastite bovina submetidas a diferentes concentrações de Gutiferona-A por 24 horas. C+ = Controle de crescimento (100µL de cultura bacteriana + 100µL de BHI); C- = Controle de esterilidade (200µL de BHI)

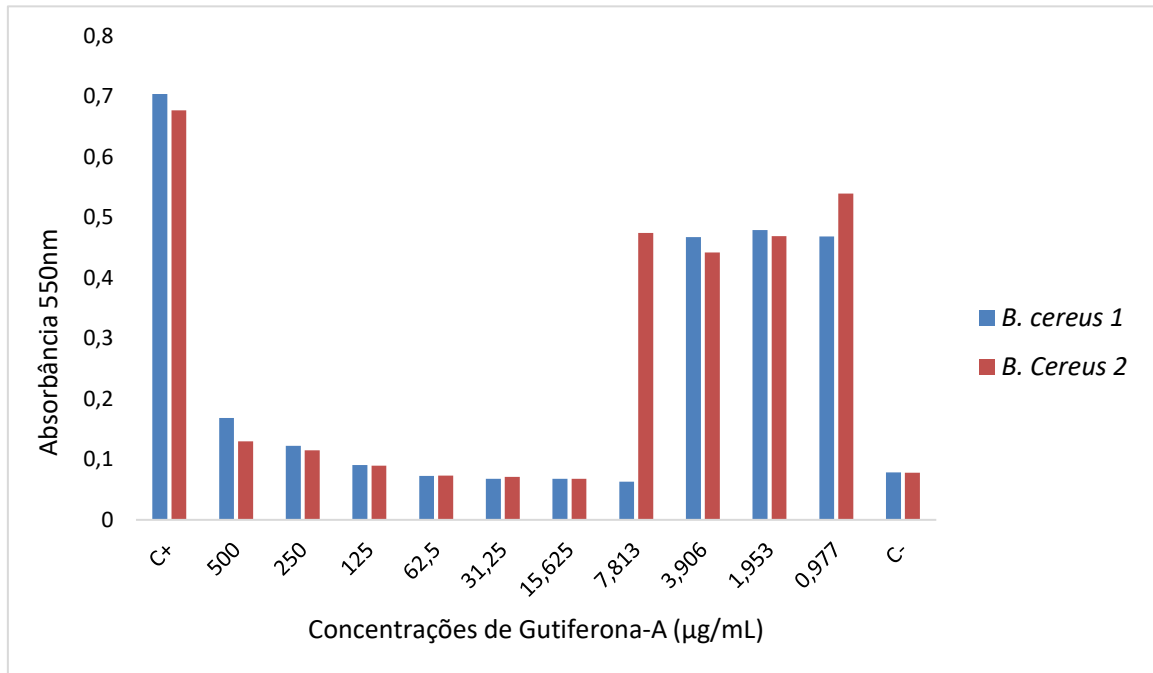
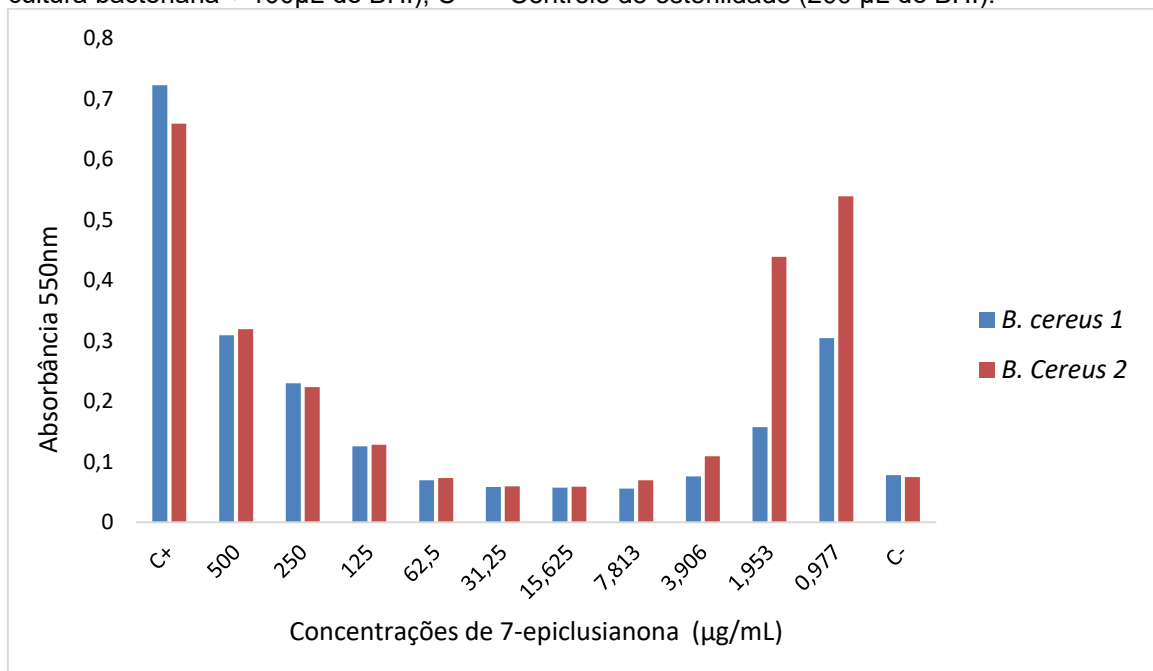


Figura 17 - Multiplicação de *B. cereus* 1 e *B. cereus* 2 isolados de mastite bovina submetidas a diferentes concentrações de 7-epiclusianona por 24 horas. C+ = Controle de crescimento (100µL de cultura bacteriana + 100µL de BHI); C- = Controle de esterilidade (200 µL de BHI).



MATERIAL SUPLEMENTAR III

Quadro 2 - Concentração Inibitória Mínima X Concentração do checkerboard – Antimicrobianos convencionais.

| Antimicrobianos | Concentrações do CIM ($\mu\text{g/mL}$) | | Concentrações de antimicrobianos quando associados | | | |
|-----------------------------|---|--------------------------|--|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| | | | 7-Epiclusianona ($\mu\text{g/mL}$) | | Gutiferona-A ($\mu\text{g/mL}$) | |
| | <i>Bacillus cereus</i> 1 | <i>Bacillus cereus</i> 2 | <i>Bacillus cereus</i> 1 | <i>Bacillus cereus</i> 2 | <i>Bacillus cereus</i> 1 | <i>Bacillus cereus</i> 2 |
| Ampicilina | 31,25 | 250 | *31,25 | *7,81 | *7,81 | *7,81 |
| Amoxicilina | 500 | 500 | *7,81 | *31,25 | *31,25 | *1,95 |
| Ceftiofur | 62,5 | 125 | *15,62 | 31,25 | 7,81 | 7,81 |
| Cefalexina | 62,5 | 125 | 62,5 | 250 | 15,62 | 31,25 |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima | 250/13,2 | 250/13,2 | 250 | 125 | 250 | 250 |

*Concentrações sinérgicas no checkerboard

Quadro 3 - Concentração Inibitória Mínima X Concentração do checkerboard – Substâncias Bioativas.

| Associação ao bioativo | Concentrações do bioativo (µg/mL) | |
|---|-----------------------------------|--------------|
| | 7 Epiclusianona | Gutiferona-A |
| Ampicilina + <i>Bacillus cereus</i> 1 | *0,48 | *1,95 |
| Ampicilina + <i>Bacillus cereus</i> 2 | *0,12 | *3,90 |
| Amoxicilina + <i>Bacillus cereus</i> 1 | *0,48 | *0,97 |
| Amoxicilina + <i>Bacillus cereus</i> 2 | *0,48 | *3,90 |
| Ceftiofur + <i>Bacillus cereus</i> 1 | *0,48 | 3,9 |
| Ceftiofur + <i>Bacillus cereus</i> 2 | 7,81 | 7,81 |
| Cefalexina + <i>Bacillus cereus</i> 1 | 1,95 | 3,9 |
| Cefalexina + <i>Bacillus cereus</i> 2 | 7,81 | 31,25 |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima + <i>Bacillus cereus</i> 1 | 3,9 | 3,9 |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima. + <i>Bacillus cereus</i> 2 | 7,81 | 7,81 |
| <i>Bacillus cereus</i> 1 CIM | 1,95 | 7,81 |
| <i>Bacillus cereus</i> 2 CIM | 3,9 | 15,62 |

*Concentrações sinérgicas no checkerboard

6 CONCLUSÕES GERAIS

A ocorrência de mastite nos rebanhos amostrados foi acima dos valores ideais. *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram os gêneros mais frequentes neste trabalho, e a maioria dos isolados obtidos eram resistentes a poucos antimicrobianos testados.

Isolados de *Bacillus cereus*, bactérias menos frequentes e pouco descritos como causadores de mastite, foram as mais resistentes aos antimicrobianos testados e apresentaram a maioria dos fatores de virulência relevantes para desenvolvimento de doenças: hemolisina (*hblA*, *hblC*, *hblD*), além da citotoxina K, cereulida e regulador pleitrópico, os quais são relevantes para desenvolvimento de doenças.

As substâncias bioativas gutiferona-A e 7-epiclusianona apresentaram potencial antimicrobiano para os dois isolados de *B. cereus* além de reduzirem a concentração efetiva de antimicrobianos convencionais quando associadas a estes, efeito sinérgico, produzindo bons resultados quando associados a β -Lactâmicos. A associação da substância bioativa gutiferona-A com ampicilina não promoveu a indução da produção de biofilme pelo *B. cereus* não produtor de biofilme ou aumento da formação de biofilme pelo isolado moderado produtor; apontando uma ótima perspectiva para utilização no tratamento da mastite bovina causada por *B. cereus*.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados neste trabalho servem como base para demais pesquisas quanto a aplicabilidade das substâncias bioativas mais promissoras (gatiferrona-A e 7-epiclusianona), tendo em vista sua utilização como proposta antimicrobiana, incluindo o uso destas substâncias bioativas em tratamentos para animais provenientes de rebanhos bovinos acometidos pela mastite, com infecções instaladas por bactérias, ou até mesmo com ação antisséptica dos tetos nos procedimentos pré e pós-dipping. Estudos posteriores são necessários para avaliação dos efeitos *in vivo*.

MATERIAL SUPLEMENTAR IV





30º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **FREQUENCY AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF BACTERIA ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS OF DAIRY HERDS OF THE INTERIOR OF THE STATE OF MATO GROSSO** com a autoria de: **ALVES, T.C.S., SHEIN, F.B., PENA, J.L., MOREIRA, M.A.S.** foi apresentado na forma de pôster durante o 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso, na cidade de Maceió, AL, no período de 6 a 9 de outubro de 2019.



Carlos Pelleschi Taborá
Presidente



Jorge Luis Mello Sampaio
1º Secretário

De 06 a 09 de Outubro de 2019 - Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso - Maceió - Al

Eventos Satélites
ONE HEALTH
1º ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ESPOROTRICOSE HUMANA E FELINA
DO ISHAM WORKING GROUP ON SPOROTRICHOSIS

Organização
e Realização:
SBM Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

Patrocínio:
 **BD**
 **FAPESP**
 **CAPES**
 **CNPq**
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

31
Congresso
Brasileiro de
Microbiologia

De 22 a 24 de Outubro de 2021

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE 7-EPICLUSIANONA E GUTIFERONA-A SOBRE BACILLUS CEREUS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA com a autoria de: ALVES, T.C.S, MOREIRA, M.A.S., ALBUQUERQUE, J.L foi aceito para publicação nos Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado online no período de 22 a 24 de outubro de 2021.

ISSN número 2176-414X


Gustavo Henrique Goldman
PRESIDENTE


Waldir Pereira Elias Junior
1º SECRETÁRIO

DE 22 A 24 DE OUTUBRO DE 2021 - EVENTO 100% ONLINE

Realização



Patrocínio





05 a 07
Novembro
de 2019

22^o Encontro de Atividades Científicas
Evento Online

kroton

REALIZAÇÃO

unopar unic uniderp Anhanguera
pitágoras fama unime

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho **IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE MASTITE DE AMOSTRAS DO INTERIOR DO MATO GROSSO**, de autoria de **THÂMELA CRISTINY SIMÃO, MARIA APARECIDA SCATAMBURLO MOREIRA, RICARDO CÉSAR TAVARES CARVALHO, FABIO BERNARDO SCHEIN e MARIANA DE BARROS**, foi apresentado no 22^o Encontro de Atividades Científicas, realizado de 05 a 07 de Novembro de 2019.

Londrina, 25 de Novembro de 2019.



Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
Comissão Organizadora



23^o Encontro de Atividades Científicas

Evento Online

04 a 06
Novembro
de 2020

kroton



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE BACILLUS SPP FRENTE A ANTIMICROBIANOS USADOS NO TRATAMENTO DA MASTITE BOVINA**, de autoria de **THÂMELA CRISTINY SIMÃO, JÉSSICA LOBO ALBUQUERQUE CALDEIRA, MARIA APARECIDA SCATAMBURLO MOREIRA, RICARDO CÉSAR TAVARES CARVALHO e MARIANA DE BARROS**, foi apresentado no 23^o ENCONTRO DE ATIVIDADES CIENTÍFICAS, realizado de 04 a 06 de Novembro de 2020.

Londrina, 25 de Novembro de 2020.

Prof. Dr. Hélio Hiroshi Suguimoto
Comissão Organizadora

Resumo apresentado no IX CICLOVET e 7ª Mostra Científica do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá.



Universidade de Cuiabá

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE MASTITE DE AMOSTRAS DO INTERIOR DO MATO GROSSO

THÂMELA C. SIMÃO ALVES (UNIC - UNIVERSIDADE DE CUIABÁ);
FÁBIO BERNARDO SHEIN (UNIC - UNIVERSIDADE DE CUIABÁ);
RICARDO CÉSAR TAVARES CARVALHO (UNIC - UNIVERSIDADE DE CUIABÁ);
MARIA APARECIDA SACATAMBURLO MOREIRA (UFV - UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA);

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é caracterizada por inflamação da glândula mamária, causada principalmente por infecção bacteriana; esta pode resultar em destruição de células epiteliais e redução da capacidade produtiva do animal (Tozzetti et al., 2008). Os microrganismos causadores de mastite podem ser classificados em contagiosos e ambientais; sendo os contagiosos de maior incidência *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* (Langoni et al., 2011). Apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, podemos observar falhas, relacionadas especialmente ao crescimento da resistência bacteriana; devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, muitas vezes por falta de informações relevantes, como suscetibilidade dos agentes patogênicos (Cazoto et al., 2011; Girardini et al., 2016). Analisar os resultados do monitoramento do perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados na propriedade, é uma alternativa para tratamento adequado (Ribeiro et al., 2016). Assim, objetivou-se nesse trabalho determinar a frequência e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de mastite de bovinos leiteiros do interior de Mato Grosso.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 43 amostras de leite coletadas de animais que apresentaram mastite clínica e/ou subclínica de um total de 157 animais em lactação, de propriedades pertencentes a municípios do interior do estado de Mato Grosso: Cáceres, Araputanga e Campo Verde.



Figura 1 – Municípios de coleta de amostras

Procedimentos tradicionais de microbiologia foram utilizados para obtenção das amostras de leite e posteriormente obtenção de culturas puras. Foram obtidas 52 colônias as quais foram identificadas usando características morfo-tintoriais e bioquímicas. Os isolados foram reativados no caldo BHI, e 10µl desta cultura foram semeados em placas de Petri contendo ágar Müller Hinton, e aplicados os discos impregnados com as drogas antimicrobianas (amoxicilina, ampicilina, sulfonamidas, gentamicina, enrofloxacin, cefalexina e ceftiofur). Após incubados, realizada leitura dos halos, foi determinado o perfil de resistência dos isolados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

| Isolados | Frequência |
|------------------------------|------------|
| Staphylococcus | 46,18% |
| Streptococcus | 26,92% |
| Enterococcus | 9,61% |
| Corynebacterium bovis | 7,69% |
| Bacillus cereus | 5,76% |
| Listeria | 1,92% |
| Nocardia | 1,92% |

Tabela 1- Frequência dos isolados

| Isolados | Amp. | Amox. | Sulf. | Gent. | Cefal. | Cefti. | Enrof. |
|------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Staphylococcus | 58,33% | 33,33% | 25% | 4,16% | 8,33% | 8,33% | 8,33% |
| Streptococcus | 7,14% | 7,14% | 35,71% | - | - | 7,14% | - |
| Enterococcus | 40% | 40% | 40% | - | 20% | 20% | - |
| Coryneb. bovis | 33,33% | 33,33% | 33,33% | - | 33,33% | - | - |
| Bacillus cereus | 100% | 100% | 66,66% | - | 66,66% | 66,66% | - |
| Listeria | - | - | - | - | - | - | - |
| Nocardia | - | - | - | - | - | - | - |

Tabela 2- Perfil de resistência dos isolados

CONCLUSÃO

Devido à escassez de informações a identificação dos isolados bacterianos e a caracterização dos seus perfis de resistência/sensibilidade pode se tornar preditivos para minimizar perdas relacionadas à mastite e auxiliar no desenvolvimento socioeconômico e cultural da região.

REFERÊNCIAS

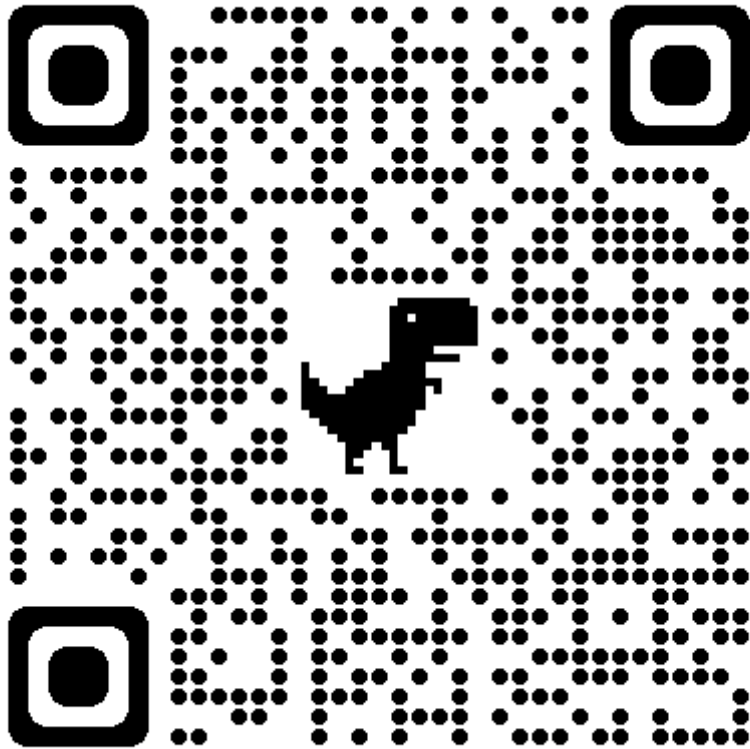
- CAZOTO, L. L., MARTINS, D., RIBEIRO, M. G., DURÁN, N. & NAKAZATO, G. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *The Journal of Antibiotics*, 64, 395-397, 2011.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- GIRARDINI, L. K., PAIM, D. S., AUSANI, T. C., LOPES, G. V., PELLEGRINI, D. C. P., BRITO, M. A. V. P. & CARDOSO, M. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* clusters on small dairy farms in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36, 951-956, 2016.
- LANGONI H., PENACHIO D. DA S., CITADELLA J.C.C., LAURINO F., FACCIOLI-MARTINS P.Y., LUCHEIS S.B., MENOZZI B.D. & SILVA A.V. DA. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesq. Vet. Bras.* 31:1059-1065, 2011.
- TOZZETTI D.S., BATAIER M.B.N., ALMEIDA L.R. & PICCININ A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. *Revta Cient. Eletr. Med. Vet.* 6:10, 2008.
- RIBEIRO M.G., LANGONI H., DOMINGUES P.F. & PANTOJA J.C.F. Mastite em animais domésticos, p.1155-1205. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. Roca, Rio de Janeiro, 2016.

APOIO FINANCEIRO:



Artigo de Revisão Publicado: Mastite Bovina: Tratamento Convencional e Ação de Compostos Extraídos de Plantas

DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2020v25n1p20-25>





UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
EDITORA UFV

Campus Universitário, Viçosa, MG – 36570-900 – Telefone / Whatsapp business: (31) 3612-2074 — E-mail: conselhoeditorial@ufv.br

DECLARAÇÃO

Declaro que **Maria Aparecida Scatamburlo Moreira** – juntamente com Mateus Mitiuzzi da Costa, David Germano Gonçalves Schwarz, Isis de Freitas Espeschit Braga, Isabel Azevedo Carvalho, Magna Coroa Lima, Sanelly Lourenço da Costa Caliman e Thamela Cristiny Simão Alves – é coautora do capítulo *Mastites em rebanhos leiteiros* que compõem o texto **Cadeias leiteiras no Brasil – produção, sanidade, processamento**, organizado por Luís Augusto Nero, Luciano dos Santos Bersot e Mateus Mitiuzzi da Costa.

Declaro também que o texto foi submetido ao Conselho Editorial da Editora UFV com vistas à publicação e se encontra em processo de avaliação.

Viçosa, 08 de abril de 2022.

Camila Rafaela Gomes Dias
Secretária do Conselho Editorial
Editora UFV
Mat.: 11188-4/UFV

Camila Rafaela Gomes Dias
Secretária do Conselho Editorial
Editora UFV



UNIVERSIDADE DE CUIABÁ - UNIC
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Biociência animal

Prezados Editores

Ciência Rural,

Estamos submetendo o manuscrito intitulado “**Ocorrência de mastite bovina em regiões produtoras de leite no estado de Mato Grosso**”, para consideração na forma de artigo científico de autoria de Thâmela Cristiny Simão Alves e colaboradores, para análise neste periódico de grande impacto para a comunidade científica, além da veiculação de informações muito importantes para produtores rurais.

Muitas são as publicações sobre o impacto causado pela mastite bovina em rebanhos leiteiros de todo o mundo, porém observamos que os estudos na área de sanidade de rebanhos leiteiros do estado de Mato Grosso são poucos. O maior conhecimento sobre seus rebanhos, identificação e caracterização de patógenos causadores da mastite, facilitaria a seleção de estratégias para melhorar a produção, além de reduzir chances de transmissão do agente e recidivas da doença. Sendo que neste estudo pôde ser observada a presença de patógenos comuns em outras regiões como causadores de mastite em rebanhos leiteiros, porém com perfis de resistência diferentes, evidenciando a importância da pressão seletiva dos antimicrobianos frente ao surgimento de bactérias resistentes. Estudos como este, abordando regiões onde a pecuária leiteira não é o principal destaque, devem ser incentivados até mesmo para maior entendimento sobre o perfil da mastite em diferentes regiões e tipos de propriedades.

Desde já agradecemos a atenção,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Thâmela", is positioned above the printed name.

Thâmela Cristiny Simão Alves
Universidade de Cuiabá,
Programa de Pós-graduação em Biociência Animal