

AValiação *IN VITRO* DO EFEITO SINÉRGICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE COM OS ANTIBIÓTICOS OXITETRACICLINA, FLORFENICOL, VANCOMICINA E BENZETACIL® CONTRA O CRESCIMENTO DE *Streptococcus agalactiae*

Nicolas RIPARI ¹, Said BEN HAMED ¹, Marco Aurelio Sivero MAYWORM ², Leonardo TACHIBANA ¹

¹Instituto de Pesca de São Paulo – APTA - SAA. Av. Francisco Matarazzo, 455 - São Paulo - SP, CEP: 05001-900.

²Centro Universitário Adventista de São Paulo (UNASP). Estrada de Itapeçerica, 5859 – São Paulo - SP. CEP: 05858-0001.

*Apoio financeiro: FAPESP, UNASP.

Palavras-chave: Apiterápico; peixes; checkerboard; microdiluição; sinergismo.

INTRODUÇÃO

Surtos de estreptococose causados por *Streptococcus agalactiae* já foram descritos na produção de pampus (AZAD *et al.*, 2012) e tilápia vermelha (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Esta doença normalmente é tratada com antibióticos. Contudo, bactérias podem tornar-se resistentes a antibióticos (MAYERS *et al.*, 2017) tornando as pisciculturas um ambiente propício para o surgimento de resistência bacteriana. Assim, é urgente investigar o potencial antimicrobiano de alternativas aos quimioterápicos. A própolis é considerada uma possível alternativa natural.

Própolis é uma mistura complexa produzida por abelhas a partir de partes aéreas de plantas (EL-BASSUONY *et al.*, 2009). Própolis verde refere-se a um tipo de própolis produzida a partir de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Alecrim-do-campo) (PARK *et al.*, 2002). O efeito sinérgico do extrato de própolis marrom com antibióticos já foi descrito contra o crescimento de algumas bactérias de importância na medicina (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2005; ORSI *et al.*, 2012). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial sinérgico antimicrobiano do extrato etanólico de própolis verde com os antibióticos Benzetacil®, Vancomicina, Florfenicol e Oxitetraciclina contra *S. agalactiae*, *in vitro*.

MATERIAL E METODOS

Obtenção do extrato etanólico bruto de própolis verde (EEP)

Uma amostra de própolis (20g) foi congelada e moída com ajuda de graal e pistilo. Após realizou-se extrações em sistema de aquecimento, com refluxo por seis horas a 60°C (n=4). O extrato, livre de cera, foi seco em placa aquecedora e câmara com sílica por 24 horas e ajustado a 20%.

Preparação dos agentes antimicrobianos

O EEP a 20% foi seco em banho-maria e câmara com sílica. A massa seca do extrato foi ressuspensa em dimetilsulfóxido estéril (DMSO) a 6%.

Os antibióticos foram suspensos em água destilada estéril nas seguintes concentrações: 12 mg mL⁻¹ para florfenicol, 200 µg mL⁻¹ para vancomicina e 400 µg mL⁻¹ para oxitetraciclina. Benzetacil® foi diluída diretamente em *Tryptic Soy Broth* (TSB) a 120 mil U mL⁻¹.

Padronização do inóculo inicial

A bactéria foi semeada em TSB por 24 horas. O inóculo turvo foi suspenso em TSB e medido em espectrofotômetro até 0,08 a 0,1 de absorbância (625 nm) (Escala 0.5 Mc Farland).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os antimicrobianos preparados, foram diluídos (1:10) em TSB. Uma placa de microtitulação foi preparada para abrigar oito concentrações diferentes (triplicatas) obtidas através de diluição seriada (1:1) num volume final de 50 µL por poço. O inóculo foi diluído em TSB (1:100) e 50 µL foi adicionado em cada poço. As placas foram incubadas a 30°C por 20 horas.

Teste de sinergismo pelo método de microdiluição em caldo: Chekerboard

Foram pipetados 125 µL de EEP e 125 µL de antibiótico no poço A1. Após isso, foi realizada diluição seriada (1:1) nas extremidades da microplaca (Coluna horizontal A, coluna vertical 1) oito vezes num volume final de 100µL por poço. A diluição seriada das colunas horizontal 2 a 8 e vertical B a H foram feitas num volume final de 50 µL por poço. O inóculo à 0.5 Mc Farland foi diluído 1:100 e adicionados 50 µL por poço para a placa ser incubada por um período de 20 horas a 30°C. Cada combinação foi realizada em triplicatas e o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) foi calculado de acordo com a formula abaixo:

$$A/MIC_A + B/MIC_B = CIF_A + CIF_B = ICIF$$

Onde A e B são CIM dos antimicrobianos em conjunto e MIC_A e MIC_B são CIM dos antimicrobianos separadamente. ICIF indicou sinergismo (≤0,5), indiferença (>0,51 a 4) ou antagonismo (>4) (FERNÁNDEZ-CUENCA *et al.*, 2003).

Incorporação de solução de rezasurina

Após o período de incubação, cada poço das placas recebeu 30 µL de rezasurina aquosa estéril a 0,01%. Após quatro horas de incubação, as placas foram observadas em relação à coloração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de CIM dos antimicrobianos foram: EEP (0,03%), benzetacil® (16 mil U mL⁻¹), florfenicol (37,5 µg mL⁻¹), vancomicina (1,25 µg mL⁻¹) e oxitetraciclina (0,62 µg mL⁻¹).

Pelo método de *Chekerboard*, apenas EEP + oxitetraciclina não apresentaram sinergismo (ICIF= 2). ICIF das demais combinações foram: EEP + Benzetacil® (0,43), EEP + florfenicol (0,07) e EEP + vancomicina (0,49).

O efeito sinérgico de extrato de própolis marrom com antibióticos, que agem na síntese proteica ou de parede bacteriana, já foi observado contra *Staphylococcus aureus* (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2005) e *Salmonella typhi* (ORSI *et al.*, 2012). Nossos resultados mostram pela primeira vez o sinergismo *in vitro* de extrato de própolis com antibióticos no combate a *S. agalactiae*. Estes dados indicam que as combinações de EEP com florfenicol ou antibióticos que agem na síntese de parede bacteriana possa ser usada no tratamento da estreptococose em peixes.

REFERÊNCIAS

- AZAD, I. S.; AL-MARZOUK, A.; JAMES, C. M.; ALMATAR, S.; AL-GHARABALLY, H.; QASEM, J. A. 2012 Outbreak of natural Streptococcosis in hatchery produced silver pomfret (*Pampus argenteus* Euphrasen) larvae in Kuwait. *Aquaculture*, 330: 15-20.
- EL-BASSUONY, A. A. 2009 New prenilated compound from Egyptian propolis with antimicrobial activity. *Rev Latinoamer Quím*, 37(1): 85-90.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J. E. C.; ORSI, R. D. O.; CUNHA, M. D. L. R. D.; MONTELLI, A. C. 2005 Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5): 563-566.
- HERNÁNDEZ, E.; FIGUEROA, J.; IREGUI, C. 2009 Streptococcosis on a red tilapia, *Oreochromis sp.*, farm: a case study. *Journal of fish diseases*, 32(3): 247-252.
- MAYERS, D. L., SOBEL, J. D., OUELLETTE, M., KAYE, K. S., MARCHAIM, D. 2017 *Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects*. (Vol. 2). Springer.
- ORSI, R. D. O.; FERNANDES, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. 2012 The effects of Brazilian and Bulgarian propolis *in vitro* against *Salmonella Typhi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Natural product research*, 26(5): 430-437.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. 2002 Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9): 2502-2506.