PAULA ADRIANE PICCOLO PIERUZZI

**Estudo da determinação da concentração inibitória mínima do muco de
Achatina fulica sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Pirassununga

2012

PAULA ADRIANE PICCOLO PIERUZZI

**Estudo da determinação da concentração inibitória mínima do muco de
Achatina fulica sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Maria de Fátima Martins

Pirassununga

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2656
FMVZ

Pieruzzi, Paula Adriane Piccolo

Estudo da determinação da concentração inibitória mínima do muco de *Achatina fulica* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 / Paula Adriane Piccolo Pieruzzi. -
- 2012.
54 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Martins.

1. *Achatina fulica*. 2. Antibioticoterapia. 3. Antimicrobiano. 4. Concentração inibitória mínima. 5. Mastite bovina. 6. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da determinação da concentração inibitória mínima do muco de *Achatina* sp sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923", protocolado sob o nº 2246/2011, utilizando 200 (duzentos) escargots, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria de Fátima Martins, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Study of determination of minimum inhibitory concentration of mucus *Achatina* sp on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923", protocol number 2246/2011, utilizing 200 (two hundred) snails, under the responsibility Profa. Dra. Maria de Fátima Martins, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PIERUZZI, Paula Adriane Piccolo

Título: **Estudo da determinação da concentração inibitória mínima do muco de *Achatina fulica* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus amados pais, Elio e Cleide Pieruzzi

À minha amada irmã Fernanda Piccolo Pieruzzi

Aos meus amados avós maternos Iracema e Renato (*in memoriam*)

Ao meu amado esposo Luciano Lagatta

Ao Tchopo e à Fifi

Dedico este trabalho com muito amor.

AGRADECIMENTO

Agradeço imensamente a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho proporcionando aprendizagem e crescimento, tanto profissional quanto pessoal.

Aos meus pais, Cleide e Elio, que desde a infância sempre valorizaram a educação, o respeito, a ética e o amor, verdadeiros pais e educadores ímpares. A minha grande irmã, companheira de todos os momentos, amiga, confidente e exemplo. Aos meus avós, Iracema e Renato (*in memoriam*), por dedicarem suas vidas a nossa educação com muito carinho e respeito. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu amado esposo, Luciano Lagatta, por todo amor, companheirismo, dedicação, paciência e apoio em todos os momentos, principalmente naqueles mais delicados.

À querida Profa. Dra. Maria de Fátima Martins, minha orientadora, pela credibilidade, confiança, orientação, compreensão, disposição e amizade dedicada durante estes anos de convívio. Por todos os momentos de empenho, ensino, pesquisa e extensão “multi, inter e transdisciplinar”.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Leite, pelo excelente convívio, auxílio, discussões e sugestões, em especial: ao Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, por toda a colaboração, orientação e por proporcionar condições para que este trabalho evoluísse. À equipe deste laboratório: pós-graduandos, Zeca e Lu pelo grande apoio, dedicação, estímulo e colaboração sempre.

Dani, obrigada por ser esta pessoa maravilhosa, amiga de aula, de bancada, de congresso, de resumos, você mora no meu coração e é uma irmã que ganhei na pós-graduação.

Aos docentes do VNP-FMVZ-USP pela viabilização na realização do projeto, pela amizade e estímulo. Em especial aos Professores Augusto Hauber Gameiro, Paulo Mazza Rodrigues, Luis Felipe Prada e Silva e Francisco Palma Rennó pelas sugestões e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pela disponibilidade e portas abertas sempre.

Aos meus amigos queridos: Dani (pós), Cris (pós), Susi (pós), João Paulo (pós), Tácia (pós), Cris Moncau (pós), Babi (pós), Papi e Esther (pós), Xibungo (pós), Frodo (pós), Andréia Baggio, Marisa França, João Forti, Francine (pós), Carol Tobias (pós), Denise, querida família Ramalho (Mariney, Alexandre, Carol e Bruno), Lígia, Paty, Viviane, Thaís, Cadu, Felipe, Márcia e Adriano, por estarem sempre presentes nestes anos de dedicação ao

projeto de pesquisa, torcendo e vibrando com cada resultado, com idéias e sugestões, e claro, palavras amigas.

Andréia Baggio, você é uma pessoa muito especial, muito obrigada por tudo! Na verdade, ganhei duas irmãs na pós, você também conquistou o meu carinho, respeito, admiração...obrigada filhote.

Aos docentes da FZEA-USP, principalmente aos Professores Ricardo Moro e Edson, muito obrigada pela atenção e colaboração.

À pesquisadora Viviane Maimone Gonçalves, Instituto Butantan, pela imprescindível colaboração para a evolução deste trabalho.

Aos funcionários da FMVZ-USP por toda a colaboração, incentivo e amizade, em especial a Alessandra, Fábiana, João Paulo, Sr. Borginho, Paula, Marcão, Alex, Junior, Adonis, Cebolinha e Bigode.

À Pré Iniciação Científica, a querida Professora Ana Paula e alunos, por transformarem as tardes de atividades no Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Helicicultura e Zooterapia em momentos de grande aprendizagem, pelo carinho e apoio.

Aos meus grandes mestres da graduação, em especial aos Professores César A. Dinola, Márcio B. Moreira, Rodrigo R. Correa, Neimar V. Roncati, Roberto Foz, Thiago S. Gomes, Cris Massoco S. Gomes, Alma Y. Hoge, Samantha Ives Miyashiro por despertarem este olhar científico ao longo de nossa convivência, por todas as aulas ministradas com profissionalismo e dedicação, pelo incentivo e colaboração para o meu ingresso na pós graduação, vocês são muito importantes para mim.

Aos motoristas da Viação Santa Cruz, profissionais queridos que durante 9 meses tornaram minhas idas e vindas diárias, São Carlos-Pirassununga, possíveis e divertidas, sempre atentos e prestativos para me “resgatar” na Anhanguera, independente das condições meteorológicas e horários diversos.

Aos animais, sempre nos proporcionando aprendizado e momentos de alegria.

À CAPES, pelo semestre de bolsa concedida.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e bolsa concedida, condição imprescindível para a dedicação demandada neste trabalho.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade e estrutura.

Muito obrigada!

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para a concretização de nossos objetivos, possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

RESUMO

PIERUZZI, P. A. P. **Estudo da determinação da concentração inibitória mínima do muco de *Achatina fulica* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.** [Study of the determination of minimum inhibitory concentration of the mucus of *Achatina fulica* on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923]. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

A mastite bovina apresenta alta prevalência nos rebanhos leiteiros e a antibioticoterapia é o procedimento mais utilizado no tratamento da mesma. O *Staphylococcus aureus*, agente etiológico mais frequentemente isolado em casos de mastite, tem demonstrado em diversos estudos aumento crescente no padrão de resistência aos antimicrobianos. O desenvolvimento de bactérias resistentes e a presença de resíduos de antimicrobianos no leite estimulam o desenvolvimento de novos tratamentos que solucionem estes problemas. O muco dos moluscos *Achatina fulica* é composto por uma glicoproteína, denominada achacin, com atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do muco de *A. fulica* sobre *S. aureus*, bem como determinar e avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) do muco de *A. fulica* purificado sobre *S. aureus* ATCC 25923 e isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina. O muco foi purificado mediante cromatografia líquida de alta eficiência e a fração com atividade antimicrobiana foi submetida à quantificação protéica e microdiluição em caldo. A CIM do muco purificado determinada para a cepa ATCC 25923 correspondeu a 50 µg/mL e para os isolados de *S. aureus*, variou entre 12,5 e 100 µg/mL. Sendo que destes, dois isolados (6,7 %) apresentaram CIM de 12,5 µg/mL, três (10 %) CIM de 25µg/mL, vinte e três (76,6 %) CIM de 50 µg/mL e dois (6,7 %) apresentaram CIM de 100 µg/mL. A CIM₅₀ para os isolados correspondeu a 50 µg/mL e a CIM₉₀ a 100 µg/mL. No presente estudo observou-se que o muco purificado apresentou atividade antimicrobiana com ação bactericida. Estes resultados proporcionam perspectivas para a compreensão e otimização de protocolos microbiológicos deste potencial biofármaco com a finalidade de empregá-lo futuramente na terapêutica veterinária para o controle de infecções intramamárias causadas por *S. aureus*.

Palavras-chave: *Achatina fulica*. Antibioticoterapia. Antimicrobiano. Concentração inibitória mínima. Mastite bovina. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

PIERUZZI, P. A. P. **Study of the determination of minimum inhibitory concentration of the mucus of *Achatina fulica* on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.** [Estudo da determinação da concentração inibitória mínima do muco de *Achatina fulica* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923]. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The bovine mastitis is highly prevalent in dairy herds and antibiotic therapy is the procedure most commonly used to treat it. *Staphylococcus aureus* is the most frequently isolated etiologic agent in cases of mastitis and it has been shown in several studies the pattern of increasing antimicrobial resistance. Due to the development of resistant bacteria and the presence of antimicrobial residues in the milk the development of new treatments to solve those problems are required. The mucus of the molluscs *Achatina fulica* contains a glycoprotein called “achacin” that presents antimicrobial activity against Gram positive bacteria. The aim of this study was the evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of the *A. fulica* mucus on *S. aureus*, as well the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of *A. fulica* mucus purified on *S. aureus* ATCC 25923 and isolates of *S. aureus* from bovine intramammary infections. The mucus was purified by high performance liquid chromatography. The protein content in portion presenting the was quantified and microdiluted. The MIC determined for the purified mucus strain ATCC 25923 was 50 µg/mL and for the isolates of *S. aureus* ranged between 12,5 and 100 µg/mL. Among these samples, two isolates (6,7 %) showed MIC of 12,5 µg/mL, three (10 %) of MIC 25 µg/mL, twenty-three (76,6 %) MIC of 50 µg/mL and two (6,7 %) had an MIC of 100 µg/mL. The MIC₅₀ for isolates was 50 µg/mL and MIC₉₀ to 100 µg/mL. It was found that the purified mucus showed bactericidal activity. The results showed in the present work improved the understanding and optimization of the biopharmaceutical microbiological potential that could be applied in new protocols in future veterinary therapy for the control of intramammary infections caused by *S. aureus*.

Keywords: *Achatina fulica*. Antibiotic. Antimicrobial minimum inhibitory concentration. Bovine mastitis. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caixa de madeira com moluscos <i>A. fulica</i>	28
Figura 2 - Mensuração da massa dos moluscos <i>A. fulica</i>	28
Figura 3 - Extração do muco mediante estimulação manual da glândula podal	29
Figura 4 - Homogeneização em vórtex do muco de <i>A. fulica</i>	30
Figura 5 - Aplicação das diluições sucessivas de muco purificado e meio de cultura	36
Figura 6 - Aplicação da cultura de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	36
Figura 7 - Disco-difusão em ágar do muco, <i>in natura</i> (puro) e diluído, sobre a cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	39
Figura 8 - Disco-difusão em ágar do muco purificado e da gentamicina, controle positivo, sobre a cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	40
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para identificação de frações protéicas do muco de <i>A. fulica</i> purificado	41
Figura 10 - Microdiluição em caldo do muco de <i>A. fulica</i> purificado sobre isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de infecções intramamárias bovina com a utilização do revelador tetrafeniltetrazólico	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Apresentação do muco de <i>A. fulica</i> , <i>in natura</i> e diluído, e respectivos diâmetros dos halos de inibição de crescimento da cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	39
Tabela 2 - Apresentação do muco de <i>A. fulica</i> , com e sem atividade antimicrobiana, e respectivos volumes e diâmetros dos halos de inibição de crescimento da cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923	40
Tabela 3 - Concentração protéica do <i>pool</i> de muco de <i>A. fulica</i> purificado, com atividade antimicrobiana sobre a cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, e respectivo volume e diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano	41
Tabela 4 - Frequência dos isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de infecções intramamárias bovina e respectivas concentrações inibitórias mínimas determinadas.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	MASTITE BOVINA	18
3.1.1	Etiologia da mastite bovina: <i>S. aureus</i>	20
3.1.2	Tratamento e controle da mastite bovina	21
3.2	SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DO <i>S. AUREUS</i> CAUSADOR DE MASTITE BOVINA.....	22
3.3	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS ANTIMICROBIANOS FRENTE AO <i>S. AUREUS</i>	23
3.4	MOLUSCOS <i>ACHATINA FULICA</i>	24
3.4.1	Uso terapêutico do muco de <i>A. fulica</i>	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	LOCAIS DE EXECUÇÃO DO ESTUDO	27
4.2	CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MOLUSCOS <i>A. FULICA</i>	28
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DO MUCO, <i>IN NATURA</i> E DILUÍDO, SOBRE <i>S. AUREUS</i> ATCC 25923	29
4.3.1	Coleta e preparo do muco de <i>A. fulica</i>	29
4.3.2	Preparo do inóculo	30
4.3.3	Técnica de disco-difusão em ágar: muco <i>in natura</i> e diluído	30
4.4	PURIFICAÇÃO DO MUCO DOS MOLUSCOS <i>A. FULICA</i>	31
4.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	31
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DO MUCO PURIFICADO SOBRE <i>S. AUREUS</i> ATCC 25923	32
4.5.1	Preparo do muco purificado	32
4.5.2	Preparo do inóculo	32
4.5.3	Técnica de disco-difusão em ágar do muco purificado	33
4.5.4	Quantificação protéica do muco purificado	34

4.6	DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUCO PURIFICADO SOBRE <i>S. AUREUS</i> ATCC 25923	34
4.6.1	Preparo do muco purificado.....	34
4.6.2	Preparo do inóculo	35
4.6.3	Método de microdiluição em caldo do muco purificado.....	35
4.7	DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUCO PURIFICADO SOBRE ISOLADOS DE <i>S. AUREUS</i> PROVENIENTES DE INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS BOVINA	37
4.7.1	Preparo do muco purificado.....	37
4.7.2	Preparo dos inóculos	37
4.7.3	Método de microdiluição em caldo do muco purificado.....	38
5	RESULTADOS	39
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DO MUCO, <i>IN NATURA</i> E DILUÍDO, SOBRE <i>S. AUREUS</i> ATCC 25923 – TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR	39
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DO MUCO DE PURIFICADO SOBRE <i>S. AUREUS</i> ATCC 25923 – TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR	40
5.3	QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA DO MUCO PURIFICADO COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ELETROFORESE EM GEL DE POLICACRILAMIDA.....	40
5.4	DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUCO PURIFICADO SOBRE <i>S. AUREUS</i> ATCC 25923	41
5.6	DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUCO PURIFICADO SOBRE ISOLADOS DE <i>S. AUREUS</i> PROVENIENTES DE INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS BOVINA	42
5.7	ANALISE ESTATÍSTICA.....	43
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é considerada a doença que determina os maiores prejuízos à indústria leiteira no mundo (MORONI et al., 2006; RADOSTITS et al., 2007; MUBARACK et al., 2012) pois eleva os custos de produção por reduzir o rendimento da fabricação, a qualidade e a vida de prateleira dos derivados lácteos (AULDIST; HUBLE, 1998; REKSEN et al., 2007).

Dentre as perdas relacionadas com a doença estão: o descarte do leite, gastos com tratamento, redução da produção e diminuição da vida produtiva do animal no rebanho, custos de mão de obra, honorários profissionais, morte ou descarte precoce de animais e queda na qualidade do produto final, com diminuição no rendimento industrial (LANGONI et al., 1998; LANGONI et al., 2011).

Classicamente, os microrganismos causadores de mastite podem ser divididos em agentes contagiosos e ambientais (BLOWEY; EDMONDSON, 1999). No primeiro grupo encontram-se o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e o *Corynebacterium* spp. e, no segundo grupo, *Streptococcus uberis* e outros estreptococos, enterobactérias e *Actinomyces pyogenes* (COSTA et al., 1995).

O *S. aureus*, patógeno contagioso mais frequentemente isolado do leite de vacas portadoras de mastite (LANGONI et al., 1998; SEARS; MCCARTHY, 2003; TENHAGEN et al., 2006; PIEPERS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2009; ZUTIC et al., 2012) apresenta grande importância epidemiológica e clínica nas mastites associadas à falhas no manejo de ordenha, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa (ZASCHÖCK et al., 2000; AARESTRUP et al., 2001).

Algumas características de patogenicidade do *S. aureus* contribuem para a persistência desta bactéria no tecido mamário (ZHAO; LACASSE, 2008). O inadequado uso de antimicrobianos no tratamento da doença pode promover o aparecimento de bactérias resistentes e comprometer a eficiência do tratamento (SÁ et al., 2004; AARESTRUP et al., 2004; DELUYKER et al., 2005).

Pesquisas relacionadas à susceptibilidade de patógenos causadores de mastite bovina a antimicrobianos demonstram aumento crescente no padrão de resistência (ERSKINE et al., 2002; PITKALA et al., 2004; TENHAGEN et al., 2006), principalmente para o *S. aureus* (LANGONI et al., 1991; BRITO et al., 2001; MOON et al., 2007).

A evolução da resistência de *S. aureus* a diversos antimicrobianos suscita preocupação (WANG et al., 2008). O uso contínuo destes fármacos por um longo período, assim como a administração dos mesmos em doses elevadas representam um risco potencial, pois podem promover a seleção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos e elevar a quantidade de resíduos no leite (GOPINATH et al., 2011; MUBARACK et al., 2012).

A investigação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* para isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina é importante para a adequada instituição do tratamento terapêutico (MORONI et al., 2006). Os resultados dos testes de susceptibilidade auxiliam o médico veterinário clínico na escolha do antimicrobiano adequado evitando, desta forma, a multirresistência (SUMANO; OCAMPO, 1992; FRANCIS, 1998; BRITO et al., 2001; SABOUR et al., 2004).

A adoção da antibioticoterapia deve visar à eficácia terapêutica e benefícios econômicos, tanto do ponto de vista do aumento da produção como na redução de fontes de infecção, evitando-se a propagação da resistência bacteriana aos fármacos (PINTO et al., 2001).

Na tentativa de melhorar a resposta ao tratamento, várias classes de compostos antimicrobianos, combinações de fármacos e vias de administração têm sido investigados, assim como a utilização de polipeptídeos, citocinas, imunomoduladores e vacinas (BARKEMA et al., 2006).

Os produtos naturais derivados da fauna brasileira, especialmente venenos e secreções cutâneas, são fontes ricas de novas moléculas químicas, as quais podem ser utilizadas como protótipos farmacêuticos no desenvolvimento de novas medicações (TEMPONE, 2007).

Moluscos terrestres *Achatina fulica* possuem em seu muco cutâneo atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus* spp.) e negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (IGUCHI et al., 1982; KUBOTA et al. 1985). Esta atividade antimicrobiana é atribuída ao achacin, glicoproteína presente no muco destes animais (OBARA et al., 1992), cujo mecanismo de ação corresponde à inibição da síntese de peptidoglicano na superfície celular bacteriana com ação bactericida (OTSUKA-FUCHINO et al., 1992).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do muco de *Achatina fulica* sobre *Staphylococcus aureus*, principal agente etiológico da mastite bovina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar e avaliar a concentração inibitória mínima do muco de *Achatina fulica* purificado sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- b) Determinar e avaliar a concentração inibitória mínima do muco de *Achatina fulica* purificado sobre isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MASTITE BOVINA

A saúde da glândula mamária depende de fatores relacionados ao animal, meio ambiente e manejo dos rebanhos, e interfere diretamente na qualidade do leite produzido e de seus derivados (SOUZA et al., 2005).

A mastite é a principal doença do gado leiteiro, possui alta prevalência e constitui um fator limitante nas propriedades leiteiras devido às perdas econômicas (LANGONI et al., 2011; MUBARACK et al., 2012). Estas são decorrentes de vários fatores, tais como a diminuição da produção, custos com mão de obra, honorários profissionais, gastos com medicamentos, morte ou descarte precoce de animais e queda na qualidade do produto final, com diminuição do rendimento industrial (LANGONI et al., 1998).

Esta enfermidade é definida como a inflamação da glândula mamária, ocorre principalmente em resposta à infecção bacteriana intramamária, porém também pode ser causada por microrganismos como fungos, algas ou *Mycoplasma*. Traumas mecânicos, térmicos e químicos também podem predispor a glândula mamária à inflamação (ZHAO; LACASSE, 2008).

Os microrganismos causadores de mastite bovina são divididos em dois grupos em função de suas características, os contagiosos, cuja fonte principal é o úbere e sua disseminação ocorre entre os animais durante a ordenha e, os ambientais, geralmente presentes no meio ambiente no qual os animais vivem, a partir dessa fonte alcançam a glândula mamária, via canal galactóforo promovendo imediata resposta inflamatória. De maneira geral, os patógenos envolvidos são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis* e as enterobactérias (BARRET, 2002; BRADLEY, 2002).

Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da mastite bovina revelam que os microrganismos de origem contagiosa são os mais prevalentes e, dentre estes, o gênero *Staphylococcus* destaca-se pela elevada frequência em casos clínicos e subclínicos da doença,

sendo o *S. aureus* a espécie de maior relevância para a indústria leiteira (ZSCHÖCK et al., 2004).

A mastite pode ser classificada em dois tipos principais, quanto a sua forma de manifestação, em clínica e subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por sinais evidentes de manifestação da doença, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária e/ou presença de grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite, independentemente da contagem de células somáticas (CCS) do leite. O quadro de mastite clínica pode ser acompanhado por sinais e sintomas sistêmicos, como aumento da temperatura retal, depressão, desidratação, diminuição do consumo de alimentos e da produção de leite (PHILPOT; NICKERSON, 2000; SANTOS; FONSECA, 2007).

Por outro lado, a mastite subclínica caracteriza-se pela ausência de alterações visíveis no leite ou no úbere. No entanto, ocorre redução da produção, mudanças na composição do leite e aumento da CCS, dos teores de cloreto, sódio e proteínas séricas, diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura do leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

É uma doença de difícil controle e erradicação apesar do grande impacto econômico, sobretudo por sua forma subclínica que passa despercebida entre os animais do rebanho leiteiro. A frequência das formas clínica e subclínica constituem um parâmetro consagrado para avaliação do estado sanitário do úbere (SORDILLO et al., 2002).

Segundo Brito et al. (2001), diversos estudos relacionados à susceptibilidade dos patógenos causadores da mastite bovina aos antimicrobianos no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para o *S. aureus*.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode ser explicada devido ao tratamento parenteral e/ou intramamário de animais em lactação e representam o principal ponto crítico de controle de contaminação química do leite. Os riscos à saúde do consumidor são representados principalmente pelo possível desencadeamento de reações alérgicas em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestório dos consumidores (MANSUR et al., 2003).

3.1.1 Etiologia da mastite bovina: *S. aureus*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina com caráter subclínico e crônico. Dentre as espécies mais frequentemente isoladas o *S. aureus* é um patógeno primário, responsável por infecções clínicas e subclínicas e elevada CCS no leite (HODGES et al., 1984; ROBERSON et al., 1996; CAPURRO et al., 1999). Duas outras espécies coagulase positiva, *S. hyicus* e *S. intermedius*, têm sido relatadas como causas de mastite, mas são encontradas menos frequentemente nos rebanhos leiteiros. As demais espécies de *Staphylococcus*, classificadas como coagulase negativa, são consideradas patógenos secundários (GIANNECHINI et al., 2002; BRITO et al., 2011).

Embora existam variações nas taxas de isolamento, conforme autor e região estudada, o *S. aureus* está dentre os microrganismos mais prevalentes mundialmente nos rebanhos leiteiros (TOLLERSRUD et al., 2000). Nas principais bacias leiteiras do estado de São Paulo houve o isolamento de 5.216 microrganismos em amostras de leite, dos quais 65,5% eram *S. coagulase* positiva (COSTA et al., 2000).

O *S. aureus* possui fatores de patogenicidade que contribuem para a sua persistência no tecido mamário, como produção de toxinas extracelulares e enzimas (SANTOS et al., 2003; LEE, 2003). Este patógeno possui uma variedade de fatores de virulência: proteína A, cápsula (fator antifagocitário) e toxinas (alfa e beta). Estes fatores interferem na função neutrofílica, permitindo a evolução de uma infecção aguda em crônica (FOX et al., 1996).

Segundo Hamill et al. (1986), os *S. aureus* aderem às células endoteliais por meio de receptores de adesinas e são fagocitados, desta maneira o ambiente intracelular impede a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos efeitos dos antimicrobianos.

A aderência, multiplicação e produção de toxinas favorecem a sobrevivência deste patógeno dentro da glândula mamária o que impede a ação de macrófagos, fatores quimiotáticos e mediadores inflamatórios culminando no influxo de neutrófilos, na redução de síntese, secreção, degeneração e morte celular (ZHAO; LACASSE, 2008; IKAWATY et al., 2010).

O agente multiplica-se rapidamente no interior dos ductos lactíferos, atravessa a parede dos mesmos em direção aos vasos linfáticos adjacentes e estimula a defesa imediata pelos neutrófilos, que passam dos capilares sanguíneos para os ductos. Os danos causados à parede dos ductos, especialmente aos pequenos ductos e ácinos secretores, interrompem a secreção de leite, frequentemente há formação de tecido fibroso no foco da infecção que

protege o *S. aureus* da ação dos antimicrobianos (PAAPE et al., 1995; FOX et al., 1996; HENSEN et al., 2000; SLADEK et al., 2005).

3.1.2 Tratamento e controle da mastite bovina

O tratamento da mastite bovina é convencionalmente realizado por antibioticoterapia, entretanto, o uso ostensivo e inadequado destes fármacos proporciona a ocorrência de resistência bacteriana a diversos princípios ativos (TORTORA, 2005).

Os antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos, como a penicilina G, as cefalosporinas e a ampicilina, são os mais utilizados para o tratamento de doenças em rebanhos leiteiros, sendo assim, os mais frequentemente encontrados no leite (PHILPOT; NICKERSON, 2000). Outros como a gentamicina, as tetraciclina e os macrolídeos são citados por Quinn et al. (2005), como antimicrobianos comumente administrados contra patógenos causadores de mastite bovina.

A administração de antimicrobianos sintéticos em demasia levou a um aumento significativo da resistência dos microrganismos a estes compostos (LOPES et al., 1990; NORBBY; NORD, 2005). No caso do *S. aureus*, a resistência múltipla resulta da presença de plasmídeos do gene *mecA*, mutações cromossômicas e de elementos transponíveis (HIRAMATSU et al., 2001).

Os resíduos de antimicrobianos podem ser detectados no leite após o animal ter sido tratado por qualquer via de administração, intramamária, intramuscular, intrauterina, intravenosa, oral ou subcutânea. A persistência do mesmo no leite varia de acordo com o produto e depende de uma série de variáveis, tais como: a dose, a via de administração, a solubilidade e o estado de saúde do animal (BRITO et al., 2000; SILVA et al., 2012).

Sendo assim, diante da necessidade de encontrar novas bases com atividade antimicrobiana com a finalidade de garantir a eficácia do tratamento de infecções intramamárias bovina, observa-se um crescente interesse por novas moléculas bioativas com o objetivo de empregar novas terapêuticas promovendo benefícios aos animais, consumidores, produtores, indústria e meio ambiente (REKSEN et al., 2007).

3.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DO *S. AUREUS* CAUSADOR DE MASTITE BOVINA

Estudos referentes à susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite bovina demonstram aumento crescente no padrão de resistência (BRITO; BRITO, 1996; LANGONI et al., 1998; SAINI et al., 2012). Isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de leite de vacas portadoras de mastite apresentam características patogênicas e de resistência a diversos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento da doença (FREITAS et al., 2005).

Muitos antimicrobianos têm sido utilizados para o tratamento da mastite, incluindo compostos que não são rapidamente absorvidos na glândula mamária, por exemplo, sulfonamidas e penicilinas, com exceção dos aminoglicosídeos e cefalosporinas de primeira geração (ZIV; STORPER, 1985; SANDHOLM, 1995; ERSKINE, 2000).

A análise da susceptibilidade do *S. aureus* aos antimicrobianos tem revelado alguns mecanismos bioquímicos deste agente, tais como inativação do antimicrobiano por enzimas que modificam ou hidrolisam o princípio ativo, alterações nos receptores-alvo por aquisição de um alvo novo promovendo redução da afinidade do antimicrobiano ou mutação de genes, principalmente pela atividade de efluxo do antimicrobiano. Os antimicrobianos representam importante fator seletivo para o desenvolvimento de resistência bacteriana tanto cromossomial quanto plasmidial (OLIVEIRA et al., 2007).

Em estudos realizados por Langoni et al. (2000), observou-se uma taxa de cura de 81,8% dos animais mediante a associação da enrofloxacina e amoxicilina nos casos de mastite subclínica causada por *S. aureus*. A enrofloxacina é derivada do ácido carboxílico, cujo mecanismo de ação atinge diretamente o núcleo difuso das bactérias e bloqueia a girase bacteriana, enzima de replicação do DNA, desta maneira há inibição total do metabolismo e a multiplicação do microrganismo. A amoxicilina é uma penicilina semi-sintética com uma estrutura essencial, alvo da ação de microrganismos resistentes, os quais possuem as enzimas β -lactamases que têm a capacidade de clivar o anel β -lactâmico (FREITAS et al., 2005).

O marcante aumento da prevalência de *S. aureus* multirresistentes causadores de mastite bovina é grave. A heterogeneidade genética existente em populações naturais deste agente o torna um importante patógeno responsável por casos de doenças de origem alimentar por meio da ingestão de toxinas, constituindo um problema também de saúde pública (SABOUR et al., 2004).

A susceptibilidade dos *S. aureus* aos diferentes antimicrobianos empregados no tratamento das doenças animais é de grande importância para o médico veterinário, pois visa fornecer subsídios para a terapia do animal acometido, bem como para todos os animais do rebanho submetidos às mesmas condições de manejo e, portanto, sob os mesmos riscos de infecção (ERSKINE, 2000).

3.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS ANTIMICROBIANOS FRENTE AO *S. AUREUS*

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de uma substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano, desta maneira, as CIM₅₀ e CIM₉₀ correspondem, respectivamente, a menor concentração capaz de inibir a multiplicação de 50% e 90% de isolados bacterianos (CLSI, 2008).

Estudos realizados por Moroni et al. (2006), demonstram que de 68 isolados de *S. aureus* provenientes de mastite subclínica avaliados, nenhum foi susceptível a todos os antimicrobianos testados e 94% foram resistentes a 3 ou mais agentes antimicrobianos. Resultados obtidos referentes à determinação da CIM de penicilina para os 68 isolados de *S. aureus* indicaram que 69% foram resistentes a este antimicrobiano. Com relação à amoxicilina e ampicilina, os autores descreveram resistência para 100 e 98,5% dos isolados de *S. aureus* estudados.

Brito et al. (2001), mediante a determinação da CIM observaram que isolados de *S. aureus* oriundos de infecções intramamárias bovina no Brasil (clínicas e subclínicas) foram susceptíveis a cefalotina, eritromicina, gentamicina, norfloxacin e oxacilina, 91% resistentes a tetraciclina e a tilosina, 65% a ampicilina e a penicilina e, 99% a neomicina. Estes autores afirmam que a resistência a oxacilina é infrequente entre espécimes isoladas da glândula mamária bovina.

Pesquisas realizadas por Iguchi et al. (1982), relacionadas à avaliação da atividade antimicrobiana do muco de *A. fulica* sobre bactérias Gram positivas, *S. aureus* (IFO 12732) e *Bacillus subtilis* (IFO 3515), resultaram na determinação da CIM do muco purificado mediante o emprego da técnica de disco-difusão em ágar. Estes pesquisadores observaram que a CIM para estas bactérias variou entre 175 e 210 µg/mL.

Após quatro anos, Kubota et al. (1985), em pesquisa desenvolvida com o muco de *A. fulica* purificado sobre a cepa de *S. aureus* (IFO 12732) determinaram, através da técnica de disco-difusão em ágar, uma CIM igual a 5 µg/mL.

3.4 MOLUSCOS *ACHATINA FULICA*

Os moluscos são animais invertebrados que constituem um filo distinto e particular destituído de semelhança ou afinidade filogenética com qualquer outro grupo vivo. O filo Mollusca possui uma abundância de espécies, cerca de 100.000 espécies vivas, constituindo o segundo maior filo animal, sucesso este atribuível à extrema plasticidade e adaptabilidade do plano básico corporal e imunidade (CAMPION, 1961).

Estes animais podem ser encontrados no mar, na água doce e na terra e, devido a sua imunidade natural, constituída pelas barreiras de proteção anatômica e química que previnem danos aos tecidos, perda de fluido corporal e infecções por microrganismos e parasitas, obtiveram grande sucesso adaptativo e reprodutivo (BARNES; CALOW, 1995).

Os moluscos terrestres são herbívoros e comestíveis, pertencentes às famílias *Achatinidae* (África) e *Helicidae* (Europa). A espécie mais conhecida é a *Achatina fulica*, mais recomendada para as regiões tropicais e subtropicais em função de sua capacidade de adaptação a estes climas (PACHECO; MARTINS, 1998).

Segundo Lorenzi et al. (2008), os moluscos *Achatina fulica* foram introduzidos no Brasil na década de 1980, no estado do Paraná, por criadores de escargots europeus (*Helix aspersa*) pelo fato de acreditarem que a introdução desta espécie seria uma alternativa economicamente viável, pois são animais que se reproduzem em grande escala, com rápido crescimento e por apresentarem mais carne quando comparados ao gênero *Helix*.

O muco liberado pelos moluscos é um fluido viscoelástico resultante da mistura da secreção de glândulas cutâneas e apresenta, dentre outras funções, veículo de transporte de partículas da superfície ciliada, secreção de produtos, transferência de água e eletrólitos através da epiderme, auxílio na locomoção e proteção do animal contra a desidratação e a microrganismos (IGUCHI et al., 1982).

Os componentes humorais dos moluscos são constituídos por lisozimas, lecitinas e pelo sistema feniloxidase, sendo que o mecanismo de defesa celular compreende a fagocitose,

formação de nódulo, encapsulação, atrofia, necrose e liquefação do tecido (GLINSKI; JAROSZ, 1997).

Os moluscos terrestres *A. fulica* possuem em seu muco cutâneo atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus* spp.) e negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (IGUCHI et al., 1982; KUBOTA et al., 1985). Segundo Kubota et al. (1985), a fração do muco com atividade antimicrobiana é composta por duas subunidades cujos pesos moleculares correspondem a 70 e 80 Kilodaltons (KDa).

Pesquisas desenvolvidas por Obara et al. (1992), descrevem o achacin, glicoproteína presente no muco destes animais, como o responsável por exercer atividade antimicrobiana, cujo mecanismo de ação corresponde à inibição da síntese de peptideoglicano na superfície celular bacteriana com ação bactericida (OTSUKA-FUCHINO et al., 1992).

3.4.1 Uso terapêutico do muco de *A. fulica*

A secreção cutânea, muco, liberada pelos moluscos é composta por uma mistura de elevado conteúdo protéico, proveniente de várias glândulas e exsudato geral de células epiteliais (LORENZI et al., 2008) o que possibilita o desenvolvimento de formulações farmacêuticas (SANTANA, 2011).

As secreções cutâneas de muitos animais, especialmente anfíbios, representam uma importante fonte de componentes antiparasitários e antifúngicos (TEMPONE et al., 2007). O muco dos moluscos *A. fulica* apresenta uma secreção cutânea abundante com potencial terapêutico significativo, o mesmo exerce atividades biológicas relacionadas com atividade antimicrobiana e anti-angiogênica (EHARA et al., 2002).

Tempone (2007), desenvolveu um estudo inédito ao avaliar e determinar a concentração efetiva de muco com atividade anti-*Leishmania* com resultados promissores para o desenvolvimento de antiparasitários a partir do muco de *A. fulica*.

Pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Helicicultura e Zooterapia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga-SP por Martins et al. (2000, 2003), Sírío (2005) e Silva (2009), demonstraram que o muco de *A. fulica* acelerou o processo de cicatrização e, desta forma, impediu complicações posteriores

como subsequentes infecções. Silva (2009), a partir de estudos relacionados com a cicatrização epitelial de camundongos observou que o muco de *A. fulica* não apresentou efeito citotóxico *in vitro*.

Yokoya (2010), avaliou o efeito desinfetante do muco de *A. fulica* em tetos de vacas na pré e pós-ordenha comparando-o com o iodo, desinfetante comumente utilizado. Em seus resultados verificou que o muco foi tão eficiente quanto o iodo no controle da microbiota dos tetos. Adicionalmente, verificou-se que o muco proporcionou ao tecido dos tetos aspecto macio e hidratado evitando-se, portanto, a presença de fissuras que comumente ocorrem quando se faz uso do iodo e que podem representar porta de entrada aos patógenos causadores de mastite bovina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DE EXECUÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido nos seguintes laboratórios: Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Helicicultura e Zooterapia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP e Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP.

O desenvolvimento deste estudo foi dividido em cinco etapas:

- 1) Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do muco, *in natura* e diluído, sobre *S. aureus* ATCC 25923;
- 2) Purificação do muco de *A. fulica* através da cromatografia líquida de alta eficiência;
- 3) Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do muco de *A. fulica* purificado sobre *S. aureus* ATCC 25923 e quantificação protéica do mesmo;
- 4) Determinação e avaliação da concentração inibitória mínima do muco de *A. fulica* purificado sobre *S. aureus* ATCC 25923;
- 5) Determinação e avaliação da concentração inibitória mínima do muco de *A. fulica* purificado sobre isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina.

4.2 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MOLUSCOS *A. fulica*

Os animais (n= 30) selecionados para a coleta de muco foram procedentes do Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Helicicultura e Zooterapia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP. Os animais foram separados e mantidos em caixas de madeira (Figura 1) medindo 65 cm de comprimento por 40 cm de largura e 30 cm altura, a densidade populacional correspondeu a 10 animais por caixa. Os animais receberam ração base (PACHECO; MARTINS, 1998) e água *ad libitum*.

Figura 1 - Caixa de madeira com moluscos *A. fulica*

A seleção dos animais foi realizada mediante mensuração da massa corpórea (Figura 2) e determinação de suas dimensões com o auxílio de um paquímetro. O comprimento (medido do ápice à margem anterior da concha) e a largura (no ponto médio da concha) foram determinados selecionando-se aqueles com peso médio entre 120 a 180 g.

Figura 2 - Mensuração da massa dos moluscos *A. fulica*

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO MUCO, *IN NATURA* E DILUÍDO, SOBRE *S. AUREUS* ATCC 25923

4.3.1 Coleta e preparo do muco de *A. fulica*

A extração do muco dos animais foi realizada mediante a estimulação manual da superfície corporal (Figura 3), mais especificamente da glândula podal, não sendo necessário o sacrifício ou qualquer procedimento que causasse injúria aos animais estudados de acordo com a metodologia descrita por Martins et al. (2003), levando-se em consideração o bem estar dos mesmos.

Figura 3 - Extração do muco mediante estimulação manual da glândula podal

O muco coletado, volume igual a 80 mL, foi homogeneizado em vórtex (Figura 4) e aliquoteado em frascos estéreis, sendo uma alíquota submetida a diluições em solução salina 0,8% nas concentrações: 1:1, 1:2 e 1:3. Tanto as alíquotas de muco *in natura* (puro) quanto às diluídas, foram mantidas sob refrigeração no Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP até o momento de sua utilização para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *S. aureus* ATCC 25923.

Figura 4 - Homogeneização em vórtex do muco de *A. fulica*

4.3.2 Preparo do inóculo

Foi utilizado o *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), mantido no Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do muco, *in natura* e diluído.

Para tanto, 100 µL de suspensão em glicerol contendo a cepa padrão foram inoculados em 6 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Oxoid, Inglaterra), e incubadas a 37°C por 15h. Após confirmação do crescimento por turvação do meio, o inóculo padrão foi ajustado segundo o padrão de McFarland de 0,5 (equivalente a 5×10^5 UFC/mL) utilizado em até 15 minutos segundo critérios descritos no CLSI (2008).

4.3.3 Técnica de disco-difusão em ágar: muco *in natura* e diluído

Para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do muco, *in natura* e diluído, sobre *S. aureus* ATCC 25923 foi empregada a técnica de disco-difusão em ágar, de acordo com a metodologia descrita no CLSI (2008).

Discos de papel filtro com 5 mm de diâmetro foram autoclavados e impregnados com o muco, *in natura* e diluído, em solução salina 0,8%, nas concentrações: 1:1, 1:2 e 1:3. Os discos secos e impregnados com os princípios ativos foram aplicados na superfície das placas de ágar Müller Hinton (Oxoid, Inglaterra) semeadas com *S. aureus* ATCC 25923 ressuspensos e com sua concentração ajustada segundo o padrão McFarland de 0,5, em duplicata. Como controle positivo utilizou-se o disco de gentamicina, cujo halo de inibição para a bactéria em questão é conhecido, também em duplicata e em placas de petri separadas.

Cada disco foi aplicado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do ágar distribuído. As placas foram invertidas e colocadas em estufa a 35° C até 10 minutos da aplicação dos discos. Após 18 horas de incubação as placas foram retiradas da estufa e os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados. Os halos foram medidos em milímetros usando-se um paquímetro de acordo com os critérios do CLSI (2008).

O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento bacteriano detectável a olho nu. Foram considerados sensíveis os halos com diâmetro maior ou igual a 8 mm segundo metodologia descrita no CLSI (2008).

4.4 PURIFICAÇÃO DO MUCO DOS MOLUSCOS A. *FULICA*

4.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Esta atividade foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP.

Ao muco *in natura* refrigerado, volume correspondente a 60 mL, foram adicionados 120 mL de água Milli-Q, a solução foi homogeneizada e mantida sob refrigeração por 10 horas. Posteriormente, foram adicionados à solução 210 mL de etanol, a solução foi homogeneizada e refrigerada por mais 4 horas. A solução foi centrifugada, a 2900 g, por 30 minutos em centrífuga refrigerada conforme metodologia descrita por Kubota et al. (1985). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet*, volume correspondente a 5,7 g, foi ressuspensão em 20 mL de solução tampão TRIS HCl. A purificação do muco foi realizada através da

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com metodologia descrita por Kubota et al. (1985).

O muco purificado, volume correspondente a 21 mL, foi aliquoteado em 14 tubos estéreis *ependorf* de 1,5 mL para posterior identificação e avaliação das alíquotas com atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* ATCC 25923. As alíquotas foram transportadas refrigeradas em caixa térmica até o Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP no qual foram mantidas refrigeradas até o momento de sua utilização.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO MUCO PURIFICADO SOBRE *S. AUREUS* ATCC 25923

4.5.1 Preparo do muco purificado

Todas as 14 alíquotas de muco purificado permaneceram refrigeradas no Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP até o momento de sua utilização para avaliação e identificação das alíquotas com atividade antimicrobiana.

4.5.2 Preparo do inóculo

Foi utilizado o *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), mantido no Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de

São Paulo, Pirassununga-SP, para a avaliação e identificação da atividade antimicrobiana das alíquotas de muco purificado.

Desta maneira, 100 µL de suspensão em glicerol contendo a cepa padrão foram inoculados em 6 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Oxoid, Inglaterra), e incubadas a 37°C por 15h. Após confirmação do crescimento por turvação do meio, o inóculo padrão foi ajustado segundo o padrão de McFarland de 0,5 (equivalente a 5×10^5 UFC/mL) utilizado em até 15 minutos de acordo com metodologia descrita no CLSI (2008).

4.5.3 Técnica de disco-difusão em ágar do muco purificado

Para avaliação e identificação das alíquotas de muco purificado com atividade antimicrobiana foi empregada a técnica de disco-difusão em ágar segundo metodologia descrita no CLSI (2008).

Sendo assim, foram utilizados 50 µL de cada alíquota para impregnar os discos de papel filtro autoclavados. Desta maneira, os 14 discos secos e impregnados foram aplicados na superfície das placas de ágar Müller Hinton (Oxoid, Inglaterra) semeadas com *S. aureus* ATCC 25923 ressuspensos e com sua concentração ajustada segundo o padrão McFarland de 0,5, em duplicata. Como controle positivo utilizou-se o disco de gentamicina, cujo halo de inibição para a bactéria em questão é conhecido.

Cada disco foi aplicado de encontro à placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do ágar de acordo com a metodologia descrita no CLSI (2008).

As placas foram invertidas e colocadas em estufa a 35° C até 10 minutos da aplicação dos discos. Após 18 horas de incubação as placas foram retiradas da estufa e os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados. Os halos foram mensurados segundo metodologia critérios do CLSI (2008).

Os halos de inibição foram considerados as áreas sem crescimento bacteriano detectável a olho nu. Foram considerados sensíveis os halos com diâmetro maior ou igual a 8 mm (CLSI, 2008).

A mensuração dos halos de inibição de crescimento do *S. aureus* ATCC 25923 permitiu a identificação das alíquotas com atividade antimicrobiana. Estas foram transferidas para um frasco estéril constituindo um *pool* de muco purificado. O *pool* foi submetido à

quantificação protéica e utilizado para a determinação e avaliação da CIM sobre *S. aureus* ATCC 25923 e sobre isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina.

4.5.4 Quantificação protéica do muco purificado

Proteínas foram extraídas a partir de um *pool* composto por 08 alíquotas de muco purificado, volume correspondente a 12 mL, que apresentaram atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* ATCC 25923. Foram utilizados 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0,1 % (v/v) Triton-X, 0,1% (p/v) PVPP e 10 mM de peptastina. Após centrifugação (14.000 rpm, 4°C) as amostras contendo o muco purificado foram mantidas a -20°C até o momento da sua utilização. O meio líquido foi filtrado sob vácuo através de uma membrana de 20 µm. Em seguida o muco foi ressuspenso em 1 mL de água destilada, sendo posteriormente dessalinizado através de diálise contra água (abertura da membrana 7 KDa).

O peso molecular das proteínas foi determinado por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% conforme rotina do laboratório.

A concentração protéica do *pool* de muco purificado foi determinada de acordo com Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. Bandas de interesse foram excisados dos géis e em seguida, digeridos na presença de tripsina (Promega, Mannheim, Alemanha).

4.6 DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUCO PURIFICADO SOBRE *S. AUREUS* ATCC 25923

4.6.1 Preparo do muco purificado

O muco dos moluscos, purificado e quantificado, foi mantido refrigerado no Laboratório Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-

SP até o momento de sua utilização para a determinação da CIM sobre *S. aureus* ATCC 25923

4.6.2 Preparo do inóculo

Foi utilizado o *S. aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) mantido no Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, para a determinação da CIM do muco purificado.

Sendo assim, 100 µL de suspensão em glicerol contendo a cepa padrão foram inoculados em 6 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Oxoid, Inglaterra), e incubadas a 37°C por 15h. Após confirmação do crescimento por turvação do meio, o inóculo padrão foi ajustado segundo o padrão de McFarland de 0,5 (equivalente a 5×10^5 UFC/mL) utilizado em até 15 minutos de acordo com a metodologia descrita no CLSI (2008).

4.6.3 Método de microdiluição em caldo do muco purificado

As diluições do muco purificado foram realizadas de acordo com a Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico do descrita no CLSI (2008).

Foi utilizada microplaca estéril com fundo em “U” contendo 96 orifícios. A primeira coluna recebeu 100µL do muco purificado na concentração inicial, correspondente a 100 µg/mL, e 100 µL do meio de cultura líquido BHI (Oxoid, Inglaterra) e as demais colunas receberam apenas 100 µL do meio de cultura. Para diluição sucessiva, foram pipetados 100 µL da solução contida na primeira coluna (muco purificado e meio de cultura) e pipetados na segunda coluna, que continha apenas meio de cultura. Após homogeneização, 100 µL da solução contida nos poços da segunda coluna, foram pipetados e inseridos na coluna seguinte, e assim sucessivamente (Figura 5). O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 5 - Aplicação das diluições sucessivas de muco purificado e meio de cultura

Ao fim do processo de diluição do muco, 100 μL da cultura de *S. aureus* ATCC 25923 foram acrescentadas em cada poço (Figura 6). As concentrações finais do muco purificado variaram entre 100 - 0,04 $\mu\text{g/mL}$. Como controle das diluições do muco purificado, um poço contendo caldo sem muco foi inoculado com *S. aureus* ATCC 25923.

Figura 6 - Aplicação da cultura de *S. aureus* ATCC 25923

Em seguida, a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C. Para leitura, realizada visualmente, foram adicionados 50 μL de tetrafeniltetrazólico (TTC) em cada orifício, indicador de multiplicação bacteriana, que apresenta coloração avermelhada na presença de células viáveis.

Para avaliação da ação da atividade antimicrobiana do muco purificado, em bactericida ou bacteriostática, uma alíquota foi retirada do material contido no orifício (poço) que demonstrou inibição no desenvolvimento bacteriano para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 no método de microdiluição em caldo e semeada em placa de petri estéril contendo

meio de cultura ágar BHI (Oxoid, Inglaterra) segundo metodologia descrita por Nader et al. (2010).

Após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C, a alíquota semeada foi inspecionada visualmente e o resultado interpretado da seguinte maneira: multiplicação bacteriana significou ação bacteriostática e ausência de desenvolvimento bacteriano significou ação bactericida.

4.7 DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUCO PURIFICADO SOBRE ISOLADOS DE *S. AUREUS* PROVENIENTES DE INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS BOVINA

4.7.1 Preparo do muco purificado

O muco dos moluscos, purificado e quantificado, foi mantido refrigerado no Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP até o momento de sua utilização para a determinação CIM sobre isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina.

4.7.2 Preparo dos inóculos

Foram utilizados 30 isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina mantidos no banco de cultura do Laboratório de Microbiologia do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, para a determinação da CIM.

Para tanto, 100 µL de cada suspensão em glicerol contendo os isolados foram inoculadas em 6 mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Oxoid, Inglaterra), e

incubadas a 37°C por 15h. Após confirmação do crescimento por turvação do meio os 30 inóculos foram ajustados segundo o padrão de McFarland de 0,5 (equivalente a 5×10^5 UFC/mL) para serem utilizadas em até 15 minutos de acordo com metodologia descrita no CLSI (2008).

4.7.3 Método de microdiluição em caldo do muco purificado

Foram utilizadas microplacas estéreis com fundo em “U” contendo 96 orifícios. A primeira coluna recebeu 100 µL do muco purificado na concentração inicial, correspondente a 100 µg/mL, e 100 µL do meio de cultura líquido BHI (Oxoid, Inglaterra) e as demais colunas receberam apenas 100 µL do meio de cultura. Para diluição sucessiva, foram pipetados 100 µL da solução contida na primeira coluna (muco purificado e meio de cultura) e pipetados na segunda coluna. Após homogeneização, 100 µL da solução contida nos poços da segunda coluna, foram pipetados e inseridos na coluna seguinte, e assim sucessivamente. O experimento foi realizado em triplicata.

Ao fim do processo de diluição do muco, 100 µL de cada cultura dos 30 isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina foram acrescidos em cada poço. As concentrações finais do muco purificado variaram entre 100 - 0,04 µg/mL. Como controle das diluições do muco, um poço contendo caldo sem muco foi inoculado com *S. aureus* ATCC 25923.

Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C. Para leitura, realizada visualmente, foram adicionados 50 µL de tetrafeniltetrazólico (TTC) em cada orifício, indicador de multiplicação bacteriana, que apresenta coloração avermelhada na presença de células viáveis.

Para avaliação da ação da atividade antimicrobiana do muco purificado, em bactericida ou bacteriostática, foram retiradas alíquotas dos materiais contidos nos orifícios que demonstraram inibição no desenvolvimento bacteriano no método de CIM e semeados em placas de petri estéreis contendo meio de cultura ágar BHI (Oxoid, Inglaterra). Após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C, as culturas referentes aos isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina foram inspecionadas visualmente e os resultados foram interpretados conforme metodologia citada anteriormente.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO MUCO, *IN NATURA* E DILUÍDO, SOBRE *S. AUREUS* ATCC 25923 – TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

Na técnica de disco-difusão em ágar, observou-se que o muco *in natura* (puro) e diluído nas concentrações 1:1 e 1:2, produziram halos de inibição para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 com diâmetros respectivamente iguais a 12,10 e 8 mm, enquanto que na concentração 1:3 não houve a formação de halo de inibição (Tabela 1 e Figura 7).

Tabela 1 - Apresentação do muco de *A. fulica*, *in natura* e diluído, e respectivos diâmetros dos halos de inibição de crescimento da cepa de *S. aureus* ATCC 25923

Apresentação do muco dos moluscos <i>Achatina fulica</i>	Diâmetros dos halos de inibição (mm)
<i>In natura</i>	12
Concentração 1:1	10
Concentração 1:2	8
Concentração 1:3	0

Figura 7 - Disco-difusão em ágar do muco, *in natura* (puro) e diluído, sobre a cepa de *S. aureus* ATCC 25923

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO MUCO PURIFICADO SOBRE *S. AUREUS* ATCC 25923 – TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR

Mediante a técnica de disco-difusão em ágar, observou-se que das 14 alíquotas de muco purificado avaliadas, volume correspondente a 21 mL, 8 alíquotas produziram halos de inibição para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 2 e Figura 8).

Tabela 2 - Apresentação do muco de *A. fulica*, com e sem atividade antimicrobiana, e respectivos volumes e diâmetros dos halos de inibição de crescimento da cepa de *S. aureus* ATCC 25923

Apresentação do muco dos moluscos <i>Achatina fulica</i>	Volume de muco purificado (mL)	Diâmetros dos halos de inibição (mm)
Purificado	12	20
Purificado	9	0

Figura 8 - Disco-difusão em ágar do muco purificado e da gentamicina, controle positivo, sobre a cepa de *S. aureus* ATCC 25923

5.3 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA DO MUCO PURIFICADO COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ELETROFORESE EM GEL DE POLICACRILAMIDA

O *pool* composto pelas 8 alíquotas de muco purificado (volume correspondente a 12 mL) com atividade antimicrobiana observada foi quantificado obtendo-se a concentração protéica correspondente a 100 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração protéica do *pool* de muco de *A. fulica* purificado, com atividade antimicrobiana sobre a cepa de *S. aureus* ATCC 25923, e respectivo volume e diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano

Volume de muco de <i>A. fulica</i> purificado (mL)	Diâmetro do halo de inibição (mm)	Concentração protéica (µg/mL)
12	20	100

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% do *pool* composto por alíquotas de muco purificado com atividade antimicrobiana indicou a presença de duas frações protéicas com pesos moleculares próximos ao padrão albumina bovina, ou seja, 60 e 70 kDa (Figura 9).

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida para identificação de frações protéicas do muco de *A. fulica* purificado

5.4 DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUCO PURIFICADO SOBRE *S. AUREUS* ATCC 25923

A CIM do muco purificado sobre *S. aureus* ATCC 25923 determinada, mediante a técnica de microdiluição em caldo, correspondeu a 50 µg/mL, valor obtido por leitura visual com a utilização do revelador tetrafeniltetrazólico.

A partir do método de microdiluição em caldo, a amostra proveniente da CIM determinada e semeada em meio de cultura demonstrou que a atividade antimicrobiana do muco purificado apresentou ação bactericida.

5.6 DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CIM DO MUÇO PURIFICADO SOBRE ISOLADOS DE *S. AUREUS* PROVENIENTES DE INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS BOVINA

As CIMs determinadas, para os 30 isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina, variaram entre 12,5 e 100 µg/mL. Destes, dois isolados (6,7 %) apresentaram CIM de 12,5 µg/mL, três (10 %) CIM de 25 µg/mL, vinte e três (76,6 %) CIM de 50 µg/mL e dois (6,7 %) apresentaram CIM de 100 µg/mL (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4 - Frequência dos isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina e respectivas concentrações inibitórias mínimas determinadas

Concentração inibitória mínima - CIM (µg/mL)	Isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	
	(%)	(n)
12,5	6,7	2
25	10	3
50	76,6	23
100	6,7	2

Figura 10 - Microdiluição em caldo do muco de *A. fulica* purificado sobre isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina com a utilização do revelador tetrafeniltetrazólico

A partir do método de microdiluição em caldo, amostras provenientes das CIMs determinadas e semeadas em meio de cultura demonstraram que a atividade antimicrobiana do muco purificado apresentou ação bactericida para todos os 30 isolados.

5.7 ANALISE ESTATÍSTICA

Os dados de concentração inibitória mínima apresentados foram obtidos em triplicata e os resultados analisados utilizando-se desvio padrão e teste ANOVA (Bioestat 5.0).

Os resultados também foram analisados no programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2010). Para análise estatística entre as frequências das concentrações inibitórias mínimas determinadas para os isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina foi utilizado o teste qui-quadrado, proc FREQ, e para a determinação da CIM₅₀ e CIM₉₀ foi utilizado o proc UNIVARIATE.

6 DISCUSSÃO

O tratamento adequado da mastite bovina é uma das formas mais práticas e eficientes de controle, por eliminar um elo importante da cadeia epidemiológica desta enfermidade (LANGONI et al., 1998).

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos podem auxiliar o médico veterinário a selecionar o agente antimicrobiano apropriado para tratamento de infecções intramamárias causadas por *S. aureus* (MORONI et al., 2006).

De acordo com Kubota et al. (1985), os moluscos *A. fulica* possuem em seu muco cutâneo atividade antimicrobiana bastante efetiva sobre bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus* spp.) e negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Segundo Obara et al. (1992) uma glicoproteína denominada achacin, composta por duas subunidades com pesos moleculares correspondes à 70 e 80 KDa, presente no muco destes moluscos é a responsável por determinar a atividade antimicrobiana do mesmo. O mecanismo de ação desta glicoproteína corresponde à inibição da síntese de peptídeo glicano na superfície celular bacteriana com ação bactericida (OTSUKA-FUCHINO, 1992).

Pesquisas nacionais desenvolvidas no Laboratório de Ensino, Pesquisa e Extensão em Helicicultura e Zooterapia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga-SP por Martins et al. (2000, 2003), Sírío (2005), Lorenzi (2008) e Silva (2009), demonstraram que o muco de *A. fulica* acelerou o processo de cicatrização de feridas cirúrgicas e, desta forma, impediu complicações posteriores como subseqüentes infecções. Silva (2009), observou também que o muco não apresentou efeito citotóxico sobre cultura de células humanas e animais.

Yokoya (2010), avaliou o efeito desinfetante do muco deste molusco em tetos de vacas, na pré e pós-ordenha comparando-o com o iodo, e observou que o mesmo foi tão eficiente quanto o iodo no controle da microbiota dos tetos.

Diferentes autores estudaram a determinação da CIM de antimicrobianos comerciais, de extratos de plantas e de própolis sobre *S. aureus* (BRUMFITT et al., 1990; BRITO et al., 2001; PINTO et al., 2001; MORONI et al., 2006; NADER et al., 2010). No entanto, a determinação da CIM do muco de *A. fulica* sobre isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina, não foi descrito na literatura científica nacional e internacional até os dias de hoje, o que confere a este estudo inéditez.

Os resultados obtidos neste estudo relacionados à atividade antimicrobiana *in vitro* do muco de *A. fulica*, *in natura* e diluído, sobre *S. aureus* ATCC 25923 demonstraram diminuição proporcional do diâmetro dos halos de inibição de crescimento bacteriano à medida que a concentração do muco foi reduzida.

A observação da atividade antimicrobiana do muco, tanto *in natura* quanto purificado, sobre *S. aureus* ATCC 25923, utilizando-se o método de disco-difusão em ágar, corroboram com os descritos na literatura por Iguchi et al. (1982) e Kubota et al. (1985).

Comparando-se à atividade antimicrobiana do muco, *in natura* e purificado, mediante a mensuração dos halos de inibição de crescimento de *S. aureus* ATCC 25923, observou-se que o muco purificado apresentou atividade antimicrobiana mais efetiva, provavelmente em função do muco purificado apresentar maior concentração protéica após a cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados referentes à determinação dos pesos moleculares do muco purificado, 70 e 80 KDa, estão próximos aos descritos por Kubota et al. (1985), no qual a glicoproteína proveniente do muco de *A. fulica* apresenta duas subunidades, com pesos moleculares que correspondem a 70 e 80 KDa.

A CIM de muco purificado determinada para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 correspondeu a 50 µg/mL e para os 30 isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina, variou entre 12,5 e 100 µg/mL, observou-se que: dois isolados (6,7 %) apresentaram CIM de 12,5 µg/mL para o muco purificado, três (10 %) CIM de 25 µg/mL; vinte e três (76,6 %) CIM de 50 µg/mL e dois (6,7%) apresentaram CIM de 100 µg/mL.

Mediante análise estatística, foi possível determinar a CIM₅₀, 50 µg/mL e CIM₉₀, 100 µg/mL, confirmando-se a efetiva atividade antimicrobiana do muco purificado sobre os isolados de *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana observada, para cada CIM determinada, apresentou ação bactericida, tanto para a cepa ATCC 25923 quanto para os isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina, resultados que corroboram com o observado por Obara et al. (1992).

A partir destes ensaios microbiológicos *in vitro* evidenciou-se a atividade antimicrobiana do muco purificado sugerindo características satisfatórias e com potencialidade no tratamento de infecções intramamárias causadas por *S. aureus*.

É imprescindível considerar a realização de estudos para a avaliação do desempenho da atividade antimicrobiana do muco de *A. fulica* purificado *in vivo*, já que estudos comprovaram a ausência de efeito citotóxico do mesmo.

7 CONCLUSÃO

Os parâmetros microbiológicos do muco de *Achatina fulica* contemplados neste estudo fornecem informações sobre a existência de atividade antimicrobiana *in vitro* do mesmo sobre *S. aureus*.

O muco purificado exerceu atividade antimicrobiana mais efetiva comparado ao muco *in natura*. A atividade antimicrobiana observada, para cada CIM determinada com o muco purificado, apresentou ação bactericida, tanto para a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 quanto para os isolados de *S. aureus* provenientes de infecções intramamárias bovina.

Portanto, os resultados apresentados no presente estudo permitem uma maior elucidação e otimização de protocolos microbiológicos deste potencial biofármaco visando seu emprego na terapêutica veterinária para o controle de mastite bovina causada por *S. aureus*, contribuindo para o desenvolvimento de substâncias mais eficazes e menos tóxicas no tratamento e prevenção de microrganismos resistentes, além de proporcionar atoxicidade de efeitos residuais de suma importância para a saúde do animal e do ser humano.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORBG, H.. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 2054-2059, 2001.
- AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, p. 380-388, 2004.
- AULDIST, M. J.; HUBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 1, p. 28-36, 1998.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1877-1895, 2006.
- BARNES, R. S. K.; CALOW, P.; OLIVE, P. J. W. **Os invertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora. 1995. 526 p.
- BARRET, D. High somatic cell counts- a persistent problem. **Irish Veterinary Journal**, v. 55, n. 4, p. 173-178, 2002.
- BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Control de la mastitis**. Zaragoza: Acribia, 1999. 216 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry Journal**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 114-130, 2002.
- BRITO, M.A.V. P., BRITO, J. R. F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. **In:** BRITO, J. R. F., BRESSAN, M. Controle integrado da mastite bovina. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, p.68-96, 1996.
- BRITO, M. A. P.; BRITO, J. R. F.; CORDEIRO, F. M; COSTA, W. A; FORTES, T. O. Caracterização de biótipos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, p. 425-429, 2000.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 531-537, 2001.
- BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; BRITO, J. R. F.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do

rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36-40, 2011.

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. **Microbios**, v.62, n. 250, p. 19-22, 1990.

CAMPION, M. The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. **The Quartely Journal on Microscopical Science**, v. 102, p. 195-216, 1961.

CAPURRO, A.; CONCHA, C.; NILSSON, L.; OSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, n. 4, p. 315-321, 1999.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. USA: CLSI; 2008. p. 37-69. Supplement M100-S18.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A., PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 156-180, 1995.

COSTA, E. O.; RAI, R.; WATANABE, E. T.; GARINO JÚNIOR, F. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios não tratados. **Revista Napgama**, v. 3, n. 4, p. 14-17, 2000.

COSTA, E. O.; GARINO JUNIOR, F.; MELVILLE, P. A. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Revista Napgama**, v. 3, n. 4, p. 6-13, 2000.

DELUYKER, H. A.; VAN OYE, S. N.; BOUCHER, J. F. Factors affecting cure and somatic cell count after pirlimycin treatment of subclinical mastitis in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 604-614, 2005.

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by Lamino acid oxidase activity. **FEBS Letters**, v. 531, n. 3, p. 9-12, 2002.

ERSKINE, R. J. **Antimicrobial drug use in bovine mastitis**. Ames: Blackwell Publishing, 2000. 800 p.

ERSKINE, R. J.; WALKER, C. A.; BOLIN, P. C.; BARTLETT, D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1111-1118, 2002.

FOX, L. K.; CUMMING, M. S. Relationship between thickness, chapping and *Staphylococcus aureus* colonization of bovine teat tissue. **Journal of Dairy Research**, v. 9, p. 1865-1873, 1996.

FRANCIS, P. G. Mastitis therapy, **British Veterinary Journal**, v. 145, p. 302-3011, 1998.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L.M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivo isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GIANNEECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; LOPEZ, J. M. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 43, n. 4, p. 221-230, 2002.

GLINSKI, Z.; JAROSZ, J. Molluscan immune defenses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 45, n. 2, p. 149-155, 1997.

GOPINATH, S. M.; SUNEETHA, T. B.; MRUGANKA, V. D.; ANANDA, S. Chemical profiling and antibacterial activity of *Punica granatum* L. against pathogens causing bovine mastitis. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 5, p. 514-518, 2011.

HAMILL, R. J.; VANN, J. M.; PROCTOR, R. A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by culture bovine aortic endothelial cells: models for postadherence events in endovascular infections. **Infection Immunology**, v. 54, p. 833-836, 1986.

HENSEN, S. M.; PAVICIC, M. J.; LOHUIS, J. A.; POUTREL, B. Location of *Staphylococcus aureus* within experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 *in situ*. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1966-1975, 2000.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, p. 486-493, 2001.

HODGES, R. T.; JONES, Y. S.; HOLLAND, J. T. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 32, n. 9, p. 141-145, 1984.

IGUCHI, S. M. M.; AIKAWA, T.; MATSUMOTO, J. J. Antibacterial activity of snail mucus mucin. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 27, n. 3, p. 571- 574, 1982.

IKAWATY, R.; BOUWER, E. C.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates in the Netherlands. **Journal of Dairy Science**, v. 5, p. 60-70, 2010.

KUBOTA, Y.; WATANABE, Y.; OTSUKA, H.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T.; MATSUMOTO, J. J. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 82, n. 2, p. 345-348, 1985.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F. Etiologia e susceptibilidade da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, p. 507-515, 1991.

LANGONI, H.; SILVA, A. V.; CABRAL, K. G.; DOMINGUES, P. F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, p. 204-210, 1998.

LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N.; SILVA, A. V.; SOUZA, L. C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 177-180, 2000.

LANGONI, H.; PENACHIO, D.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LEE, J. H. Methicillin (oxacilin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 6489-6494, 2003.

LOPES, C. A.; MORENO, G.; CURI, P. R.; GOTTSCHALK, A. F.; MODOLO, J. R.; HORACIO, A.; CORRÊA, A.; PAVAN, C. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. **British Veterinary Journal**, London, v. 146, n. 5, p. 443-448, 1990.

LORENZI, A. T. Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina* sp alimentados com ração diferenciada. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

LORENZI, A. T.; MARTINS, M. F. Análise colorimétrica e espectroscópica do muco de caracóis terrestres *Achatina* sp alimentados com ração diferenciada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 572-579, 2008.

MARTINS, M. F.; PACHECO, P. Escargot sem preconceito. **Revista Pesquisa FAPESP**, v.51, p.32-34, 2000.

MARTINS, M. F.; PACHECO, P. MIZUSAKI, C. I.; IYOMASA, M. M.; SILVESTRI JUNIOR, P. I.; FUZETO, A. P. Avaliação fenotípica e histológica de feridas cirúrgicas de coelhos tratados com secreção mucoglicoprotéica de escargot *Achatina fulica*. **Arquivos do Instituto Biológico**, n. 67, p. 130-145, 2000.

MARTINS, M. F.; CAETANO, F. A. M.; SÍRIO, O. J.; IYOMASA, M. M.; MIZUSAKI, C. I.; FIGUEIREDO, L. D.; PACHECO, P. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratados com secreção mucoglicoprotéica de escargots *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 213-218, 2003.

MANSUR, P. U.; FOLLY, M. M.; CARLOS, L. A.; ARAÚJO, F. M.; GAI, Z. T.; TEIXEIRA, G. N. Avaliação do período de persistência do antibiótico cloxacilina no leite de vacas com mastite subclínica. **Revista de Higiene e Alimentação**, v. 17, n. 104/105, p. 106, 2003.

- MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V. S.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; TELES, J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus aureus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 569-574, 2009.
- MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E. S.; KIM, M. N.; PAIK, Y. H.; PARK Y. H.; JOO, Y. S.; KOO, H. S. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1176-1185, 2007.
- MORONI P.; PISONI G.; ANTONINI M.; VILLA R.; BOETTCHER P.; CARLI S. Short Communication: Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus aureus* from Subclinical Bovine Mastitis in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2973-2976, 2006.
- MUBARACK, H. M.; DOSS, A.; VIJAYASANTHI, M.; VENKATASWAMY, R. Antibacterial activity of some herbal extracts against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, p. 2428-2430, 2012.
- NADER, T. T.; COPPEDE, J. S.; AMARAL, L. A.; FACCHIN, A. L.; PEREIRA, A. M. S.; FERREIRA, L. M. Potencial de atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais do cerrado frente estirpes de *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 429-433, 2010.
- NORRBY, S. R.; NORD, C. E. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 115-119, 2005.
- OBARA, K.; OTSUKA-FUKINO, H.; SATTAYASAI, N.; NONOMURA, Y.; TSUCHIYA, T.; TAMIYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant african snail, *Achatina fulica* Férussac. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, p. 1-6, 1992.
- OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA FILHO, R. N. Interference of *Plectranthus amboinicus* spreng essential oil on the anti-candida activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 17, p. 186-190, 2007.
- OTSUKA-FUCHINO, H.; WATANABE, Y.; HIRAKAWA, C.; TAMIYA, T.; MATSUMOTO, J. J.; TSUCHIYA, T. Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant African snail, **Elsevier**, v. 101, n. 3, p. 607-613, 1992.
- PAAPE, M. J., CAPUCO A. V.; GUIDRY, A. J.; BURVENICH, C. Morphology, function, and adaptation of mammary cells in normal and disease states. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 1-17, 1995.
- PACHECO, P.; MARTINS, M. F. O escargot. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, p. 12-20, 1998.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Winning the fight against mastitis**. Naperville: Westfalia-Surge, 2000. 188 p.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, L.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; DE VliegHER, S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 478-483, 2007.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

PITKALA, A. M.; HAVERI, S.; PYORALA, V.; MYLLYS, T. Bovine mastitis in Finland 2001 – Prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2433-2441, 2004.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, M. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: ArtMed, 2005. 512 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. Oxford: Saunders, 2007. 2065 p.

REKSEN, O. L.; SOLVEROD, A. J. Relationships between milk culture results and milk yield in Norwegian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4670-4678, 2007.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 54-57, 1996.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 167-162, 2004.

SABOUR, P. M.; GILL, J. J.; LEPP, D.; PACAN, J. C.; AHMED, R.; DINGWELL, R. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3449-3455, 2004.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; SCHOLL, D. T.; DEVRIES, T. J.; BARKEMA, H. W. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1921-1929, 2012.

SANDHOLM, M. A critical view on antibacterial mastitis therapy. In: SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T. **The bovine udder and mastitis**. Finland: Gummerus Press, 1995. 200 p.

SANTANA, W. A. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de filmes preparados com muco de *Achatina fulica* associados ou não a laserterapia**. 2011. 117 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.

SANTOS, F. G. B.; MOTA, R. A.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SOUZA, H. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; JOHNER, J. M. Q.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M.; ALBINO, T. C. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Napgama**, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SEARS, P. M.; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, p. 171-185, 2003.

SILVA, M. R. **O *Achatina fulica* e sua utilização zoterápica através de dietas acrescidas de própolis**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de antibióticos em leite. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p.30-44, 2012.

SÍRIO, O. J. Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de confrei (*Simphytum officinale*). 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; RYZNAROVA, H.; FALDYNA, M. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. **Veterinary Research**, v. 36, p. 629-643, 2005.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, p. 135-146, 2002.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. V. A. P.; BASTOS, R. R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 251-260, 2005.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. Institute Inc. Versão 9.22. Cary: SAS, 2010.

SUMANO, H.; OCAMPO, L. The pharmacological basis for the treatment of bovine mastitis –a review. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, p. 127-135, 1992.

TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S. C.; PRADO, F. O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R. M.; ANTONIAZZI, M. M.; HADDAD, C. F. B.; JARED, C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 4, n. 1, p. 67-73, 2007.

TEMPONE, A. G. Cutaneous secretion from the giant African snail, *Achatina fulica*, as a source of Antileishmanial compounds. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 73-77, 2007.

TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2542-2551, 2006.

TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ JUNIOR. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2998-3003, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo: Artmed, 2005. 920 p.

WANG, Y.; WU, C. M.; LU, L. M.; REN, G. W. N.; CAO, X. Y.; SHEN, J. Z. Macrolide-lincosamide resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 130, p. 118-125, 2008.

YOKOYA, E. **Controle de infecções intramamárias no gado leiteiro usando as propriedades antibacterianas e cicatrizantes do muco de escargot *Achatina* sp no pré e pós dipping**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

ZHAO, X.; LACASSE, C. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 57-65, 2008.

ZIV, G.; STORPER, M. Intramuscular treatment of subclinical staphylococcal mastitis in lactating cows with penicillin G, methicillin and their esters. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, p. 275-283, 1985.

ZSCHÖCK, M.; BOTZIER, D.; BLOCHER, S.; SOMMERHAUSEN, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 569-574, 2000.

ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 493-498, 2004.

ZUTIC, M.; ZUTIC, J.; CIRKOVIC, I.; RADANOVIC, O.; PAVLOVIC, L.; PAVLOVIC, N.; ASANIN, J. Short Communication: Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples from Serbian cows with subclinical mastitis, **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 29, p.5887-5889, 2012.