

## Comportamento de amoxicilina e clavulanato em pH alcalino de leite de vacas com mastite

Giovanna de Medeiros Guimarães<sup>1\*</sup>, Leonardo Borges Acurcio<sup>2</sup>, Nayane Aparecida Moreira<sup>3</sup>, Bruno Henrique Cabral<sup>4</sup>, Alessandra Vilano Goulart<sup>5</sup>

DOI: <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2022.40755>

### Resumo

O leite, um alimento nobre e de grande importância para a pecuária pode sofrer impactos negativos, em especial com a ocorrência de doenças, como a mastite, que provoca alterações no pH, o que o deixa mais alcalino. A mastite causada por *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), um agente etiológico ambiental, tem como alvo tratamentos à base de β-lactâmicos, usualmente prolongado pela dificuldade no tratamento destas. Nesse sentido, sabe-se que o pH alcalino hidrolisa os β-lactâmicos em meios líquidos, assim, o objetivo do trabalho foi observar se o pH alcalino do leite de vaca com mastite ambiental provoca inativação ou redução da ação dos antimicrobianos. Para tal, leite saudável e de animais com mastite foram cedidos de uma propriedade rural em Córrego Fundo-MG onde nestes foram mensurados o pH e realizado esterilização para inoculação de cepas de *S. uberis* (previamente isolado) juntamente com uma base antimicrobiana comercial de amoxicilina e clavulanato. Ao final, foi verificado o crescimento bacteriano nas diferentes amostras. Foi realizado um antibiograma com a amostra isolada de *S. uberis* para verificar a ausência de resistência ao antimicrobiano utilizado, onde tal amostra não apresentava resistência. Dentro das condições experimentais, o micro-organismo apresentou um comportamento diferente diante dos diferentes pH das amostras, crescendo mais ( $p < 0,01$ ) no leite de mastite com pH 7,6, mesmo na presença de antimicrobiano. Com isso, enfatiza-se a necessidade da realização de mais estudos farmacológicos sobre os antimicrobianos utilizados na mastite.

**Palavras-chave:** Antimicrobianos. Mastite ambiental. Resistência bacteriana. *S. uberis*. *Streptococcus*.

## Behavior of amoxicillin and clavulanate in alkaline pH of milk from cows with mastitis

### Abstract

Milk, a noble food of great importance for dairy production can suffer negative impacts, especially with the occurrence of diseases, such as mastitis, which causes changes in pH, which makes it more alkaline. Mastitis caused by *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), an environmental etiological agent, requires β-lactam-based treatments, usually prolonged due to the difficulty in treating them. In this sense, it is known that the alkaline pH hydrolyses β-lactams in liquid media, thus, the objective of this study was to observe whether the alkaline pH of cow's milk with environmental mastitis causes inactivation or reduction of antimicrobial action. For this purpose, healthy milk and animals with mastitis were transferred from a rural property in Córrego Fundo-MG, where the pH was measured and sterilization was performed for inoculation of *S. uberis* strains (previously isolated) together with a commercial antimicrobial base of amoxicilline and clavulanato. At the end, bacterial growth was verified in all different samples. An antibiogram was performed with the isolated sample of *S. uberis* to verify the absence of antimicrobial resistance, where the sample did

<sup>1</sup>Centro Universitário de Formiga - UNIFOR - MG. Formiga, MG. Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0001-9007-8220>

<sup>2</sup>Centro Universitário de Formiga - UNIFOR - MG. Formiga, MG. Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0002-2981-5479>

<sup>3</sup>Centro Universitário de Formiga - UNIFOR - MG. Formiga, MG. Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0003-2290-5065>

<sup>4</sup>Centro Universitário de Formiga - UNIFOR - MG. Formiga, MG. Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0001-7069-6486>

<sup>5</sup>Centro Universitário de Formiga - UNIFOR - MG. Formiga, MG. Brasil.  
<https://orcid.org/0000-0001-6007-6072>

\*Autor para correspondência: [giovannamedeiros64@gmail.com](mailto:giovannamedeiros64@gmail.com)

not present resistance. Within the experimental conditions, the microorganism showed a different growth behavior in view of the different pH of the samples, growing more ( $p < 0,01$ ) in mastitis milk with pH 7,6, in antimicrobial presence. Thus, it is emphasized the need for further pharmacological studies regarding antimicrobials use in mastitis.

**Keywords:** Antimicrobials. Bacterial resistance. Environmental mastitis. *S. uberis*. *Streptococcus*.

## Introdução

O leite é um alimento nobre e completo, pois é composto por água, proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais, sendo um dos produtos de origem animal que movimenta o setor agroindustrial, representando uma importante forma de produção da pecuária brasileira.

Por sua importância econômica, cultural e social, quaisquer alterações que afetem a sua produção podem ser um problema dentro de propriedades rurais. Nesse contexto, a mastite aparece como importante causadora de impacto negativo nos rebanhos leiteiros (Santos et al., 2017).

A mastite, em especial a ambiental, é normalmente causada por bactérias oportunistas que estão em diversos locais, como o curral de ordenha, chão e, principalmente, em matérias orgânicas, como as fezes dos animais, se alojando, por exemplo, nas camas em sistemas de confinamento (Silva; Primieri, 2020). Massote et al. (2019) explicam que a contaminação dos tetos pode ocorrer mais comumente na cama dos animais.

Entre os agentes causadores da mastite ambiental, destaca-se o *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), um coco Gram +, presente na microbiota indígena e no ambiente de, sendo um importante agente causador de mastite (Langoni et al., 2017). De forma geral, bactérias como essa em questão respondem bem aos tratamentos à base de  $\beta$ -lactâmicos (Duarte et al., 2019).

No entanto, existem cerca de 70 cepas deste micro-organismo com uma grande variabilidade genética, onde algumas destas cepas podem apresentar também um caráter contagioso, podendo ser transmitidas para outros animais durante a ordenha, além de poder evoluir facilmente para as formas subclínica e crônica, se tornando assim um patógeno de complexo tratamento (Massote et al., 2019; Ulsenheimer et al., 2021). Assim, na maioria das vezes, o tratamento recomendado pelo bulário dos antimicrobianos utilizados na mastite não é eficaz, sendo necessário prolongar o uso dos antimicrobianos em até oito dias (Langoni et al., 2017; Massote et al., 2019).

Além disso, muitas das vezes ocorre a interrupção do uso de antimicrobianos antes do recomendado, pelo fato do animal apresentar uma cura clínica, ou seja, visualmente não apresenta mais sintomas de mastite (Ribeiro, 2008). Porém, isso não quer dizer que o animal apresenta uma cura bacteriológica, sendo assim, mesmo

sem sintomatologia clínica, o animal ainda pode possuir a bactéria presente no seu organismo, onde, numa interrupção de tratamento, o uso de antimicrobiano apenas por alguns dias se torna um grande problema de saúde animal e, possivelmente, de saúde pública no contexto da saúde única, por provocar resistência bacteriana e deixar os recursos antimicrobianos ainda mais escassos (Duarte et al., 2019; Massote et al., 2019; Pisseti et al., 2021, Ribeiro, 2008).

Sabe-se então que a resistência bacteriana é um problema, uma vez que quando ela existe, a bactéria em questão passa a não ser mais sensível a determinado antimicrobiano e, por isso, a utilização de antimicrobianos de forma inadequada no tratamento da mastite, além de não resolver o problema, pode agravar a resistência (Pisseti et al., 2021). Por isso, para evitar impasses como estes, identificar outras possíveis formas de inativação e potencial resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos é essencial.

Nesse contexto, cabe também ressaltar que a mastite provoca alterações físico-químicas no leite, fazendo com que ocorra perda de 20% de caseína e 15% de gordura, modificação de íons (aumento de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , com diminuição de  $\text{Ca}^{++}$ ) e alterações enzimáticas que podem prejudicar o leite e os seus derivados (Massote et al., 2019; Santos et al., 2017). Sabe-se que também ocorre, em especial, a alcalinização do pH, isso porque a vaca com mastite libera histamina em resposta à infecção e, assim, a histamina deixa os capilares mais permeáveis à passagem de células e componentes sanguíneos, que por sua vez tem um pH ligeiramente alcalino, deixando assim o leite com propriedades parecidas (Massote et al., 2019; Santos et al., 2017; Silva; Primieri, 2020).

Com base no exposto, é de conhecimento que os meios líquidos alcalinizados podem provocar hidrólise de  $\beta$ -lactâmicos (Sá et al., 2018; Silva et al., 2013) e que variações de pH no leite com mastite ocorrem, deixando-o mais alcalino (Santos et al., 2017). Assim, o objetivo deste trabalho foi observar se o pH alcalino do leite de vaca com mastite ambiental provoca inativação ou redução da ação dos antimicrobianos

## Materiais e métodos

Foram cedidas três amostras de leite por uma propriedade rural da região de Córrego Fundo-MG. Essas amostras continham leites saudáveis e de vacas com

mastite, sendo algumas das amostras com mastite retiradas de animais separadamente (mastite), e outras retiradas de um tanque contendo apenas leite de vacas com mastite (tanque). Todas foram refrigeradas ( $< 7^{\circ}\text{C}$ ) e transportadas em recipientes estéreis até sua análise no Laboratório de Microbiologia do UNIFOR-MG. Todo o trabalho foi realizado com três repetições em triplicata.

Também foi fornecido pela mesma propriedade rural placas de OnFarm® (Piracicaba, SP, Brasil) contendo a identificação microbiológica de *Streptococcus uberis*, sendo o causador de mastite dos leites coletados.

Foi medido o pH de todas as amostras com um pHmetro portátil (Kasvi K39-0014PA®, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Posteriormente, 100 mL de cada leite foi esterilizado, por meio de autoclave, para garantir que todos os leites possuam a mesma quantidade de micro-organismos inoculados. Assim, os leites foram inoculados com *S. uberis* e acrescidos de antimicrobiano através de uma bisnaga comercial para tratamento de mastite, com a base de amoxicilina e clavulanato (em seringa de 8 g, contendo Amoxicilina Trihidratada 200 mg, Clavulanato de Potássio 50 mg, Acetato de Prednisolona 10 mg; Mastite clínica VL® - J.A. Saúde Animal, Patrocínio Paulista, SP, Brasil).

Para padronização do inóculo a colônia de *S. uberis* presente nas placas de SmartColor 2 da OnFarm® (Piracicaba, SP, Brasil) foi coletada e ajustada em salina estéril (NaCl 0,9 %) na turbidez de 0,5 de MacFarland ( $\sim 10^8$  UFC) (Tanikawa-Vergilio, 2020).

Em 100 mL de leite saudável e com mastite (tanque e vaca), já esterilizados, foram colocados 3 mL da solução salina com o inóculo e, juntamente, foi acrescido a quantidade de 0,1 g de amoxicilina e clavulanato. Os leites já inoculados com o micro-organismo e antimicrobiano foram refrigerados durante 8 horas. Assim, buscou-se verificar se o pH alcalino do leite de vaca com mastite influencia na ação da amoxicilina e clavulanato.

Após as oito horas, as amostras de leite novamente passaram por medição de pH pelo método supracitado e, posteriormente, foram plaqueadas em triplicata, na diluição  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , no meio de cultura ágar BHI (Kasvi; São José dos Pinhais, PR, Brasil), e incubadas por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  (Silva et al., 2021). Após esse tempo foi quantificado o número de colônias presentes nas amostras, para assim verificar se o pH alcalino do leite com mastite teve alguma influência na menor ação dos antimicrobianos.

Por fim, as placas de crescimento positivo, do leite esterilizado na diluição  $10^{-3}$ , passaram por um processo de antibiograma, onde foi verificada a resistência ou sensibilidade dos agentes microbianos à base de amoxicilina e clavulanato, por método de disco-difusão em meio Müller-Hinton, sendo avaliado a susceptibilidade do micro-organismo medindo-se o diâmetro dos halos de inibição conforme proposto inicialmente por Bauer et al.

(1966) e preconizando-se os limites estabelecidos pelo *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI, 2020).

Para a realização de todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). O teste realizado foi o teste de t Student não pareado. Foram considerados estatisticamente significativos resultados que apresentaram significância mínima de 5 % ( $p < 0,05$ ) entre si.

## Resultados e discussão

O micro-organismo utilizado como inóculo não apresentou resistência no teste de antibiograma à amoxicilina e clavulanato. Os leites inoculados com micro-organismo e antimicrobiano analisados apresentaram os respectivos pH: leite saudável - 6,8; leite individual de vaca com mastite vaca - 7,6 (identificado como: mastite) e leite de um conjunto de vacas com mastite - 7,3 (identificado como: tanque).

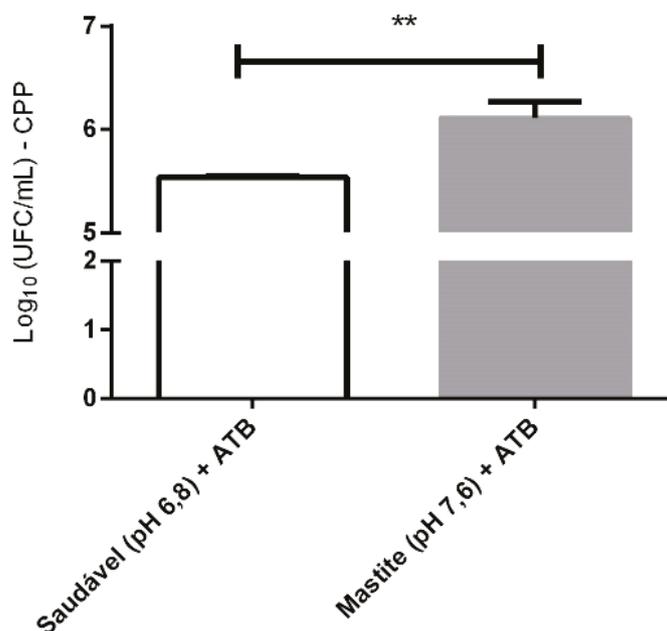
O pH do leite de animal saudável e apropriado para o consumo humano encontra-se entre 6,6 e 6,8, enquanto o pH de leite de vaca com mastite, encontra-se levemente alcalino com valores acima de 7,2 (Silva; Primieri, 2020).

Alguns autores afirmam que nos quadros de mastite causadas por *S. uberis*, o tratamento realizado durante o período de secagem apresenta resultados melhores e provoca menor incidência de casos crônicos e subclínicos (Langoni et al., 2017). Essa justificativa pode ser explicada pelo fato de que o pH alcalino, presente no leite de mastite das vacas em lactação, provocam inativação de alguns antimicrobianos, como é o caso da amoxicilina e clavulanato visto neste estudo (Figura 1).

Quando comparado o crescimento da amostra microbiológica no leite de vaca saudável e no leite individual de vaca com mastite, mediante a ação de amoxicilina (200mg) e clavulanato (50mg), os resultados mostraram influência do pH na inativação do antimicrobiano, tendo em vista o menor crescimento ( $p < 0,01$ ) de *S. uberis* em leite alcalino (pH 7,6). Resultados parecidos foram vistos por Silva et al. (2013), que evidenciaram que antimicrobianos na presença de meio alcalinos não impediam o crescimento de alguns micro-organismos.

A inativação de antimicrobianos, em especial de  $\beta$ -lactâmicos, realizada por hidrólise alcalina, é vista em diversos estudos (Sá et al., 2018; Silva et al., 2013). Isso ocorre porque o meio alcalino consegue mudar a estrutura do anel dos  $\beta$ -lactâmicos, o que faz com que sejam modificadas não somente a estrutura da molécula, como também sua polaridade, realizando a abertura do anel, levando o antimicrobiano à perda ou redução da sua função (Silva et al., 2013).

Figura 1 – Crescimento de *S. uberis* em leite de vaca saudável (pH 6,8) e em leite individual de vaca com mastite (pH 7,6) na presença de amoxicilina (200mg) e clavulanato (50mg)



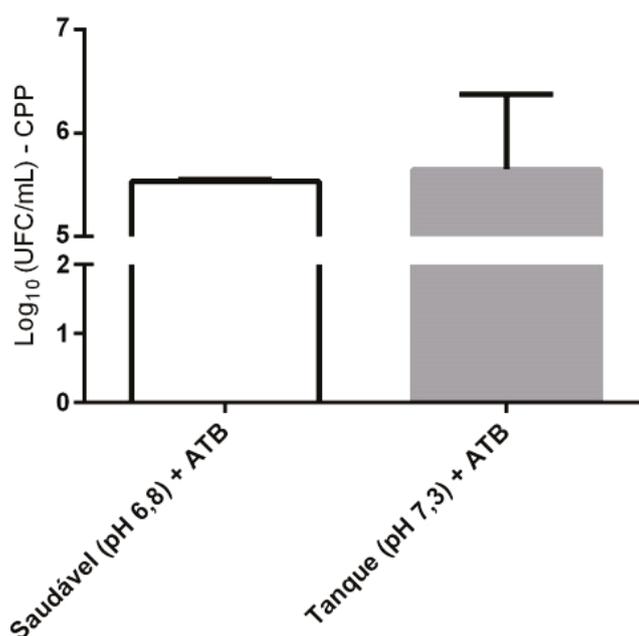
Legenda: \*\* $p < 0,01$  pelo teste t de Student.

Silva et al. (2013) também mostrou que a hidrólise alcalina ocorre aos poucos, ou seja, quanto maior o tempo de ação do pH sobre o antimicrobiano, mais a concentração do mesmo será reduzida. No caso do  $\beta$ -lactâmico amoxicilina e clavulanato, sua concentração pode ser reduzida de 100% para 0,06% em duas horas, em  $\text{pH} > 11,0$  (Silva et al. 2013). O tempo de inativação da estrutura do anel  $\beta$ -lactâmico também varia de acordo com o pH da substância no qual este se encontra, onde

para a amoxicilina, quanto maior o pH, mais rápida essa inativação ocorre (Sá et al., 2018).

Quando comparado o crescimento da amostra microbiológica no leite saudável e no leite de um conjunto de vacas com mastite (tanque), mediante a ação de amoxicilina (200mg) e clavulanato (50mg), os resultados mostraram que não houve influência significativa do pH na ação do antimicrobiano, sendo visualizados crescimentos similares em ambas as amostras (Figura 2).

Figura 2 – Crescimento de *S. uberis* em leite de vaca saudável (pH 6,8) e em leite de vaca com mastite no tanque (pH 7,3) na presença de amoxicilina (200mg) e clavulanato (50mg)



Na propriedade deste estudo, o leite de todas as vacas com mastite foi depositado em um tanque específico para leite de descarte. Este resultado provavelmente se deu em um contexto no qual o leite com pH menos alcalino incide em uma diferença de crescimento microbiano não tão evidente assim. Essa menor alcalinidade pode ter ocorrido pelo efeito de diluição do tanque. Resultados diferentes foram vistos em Silva et al. (2013), onde, até mesmo em substâncias com pH próximo da neutralidade, houve a hidrólise de antimicrobiano e o impacto no crescimento do micro-organismo.

Sabe-se que a farmacocinética e a farmacodinâmica de antimicrobianos para uso em glândula mamária de animais com mastite são avaliadas, na maioria das vezes, em animais saudáveis, o que impede de avaliar tais aspectos diante de alterações na permeabilidade vascular e dos componentes presentes no tecido alvo, como ocorre na glândula mamária de animais com mastite (Duarte et al., 2019; Langoni et al., 2017; Ribeiro, 2008). Assim, uma menor eficácia do medicamento utilizado de forma

intramamária para a mastite pode estar sendo desconsiderada (Duarte et al., 2019; Pisseti et al., 2021).

### Considerações finais

Nas condições deste estudo notou-se que, em decorrência do pH alcalino do leite individual de vacas com mastite, a presença do antimicrobiano amoxicilina (200mg) e clavulanato (50mg) foi menos eficaz ( $p < 0,01$ ) no controle do crescimento do agente etiológico ambiental causador de mastites, quando comparado ao crescimento em leite de vaca saudável. Com isso, enfatiza-se a necessidade da realização de mais estudos farmacológicos sobre os antimicrobianos utilizados na mastite, mesmo os que já se encontram no mercado, para que seja garantido um pH correto de absorção do medicamento e o tempo de aplicação entre doses seja eficiente. Logo, o tratamento ideal para mastite precisa considerar não somente fatos como cura clínica e bacteriológica da doença, mas também os impasses pontuados no trabalho em questão.

### Referências

- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4):493–496.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.
- Duarte, S.M.S.; Faria, F.V.; Lima, R.M.S.; Sampaio, J.S.; Maia, T.M.B.; Guimarães, G.R. Martins, M.O.; Deprá, L.B.B.; Fonseca, L.S. 2019. Revisão sistemática da resistência e farmacodinâmica de antibióticos. *Brazilian Journal of Development*, 5(10):21476–21489.
- Langoni, H.; Salina, A.; Oliveira, G.C.; Junqueira, N.B.; Menozzi, B.D.; Joaquim, S.F. 2017. Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37(11):1261–1269.
- Massote, V.P.; Zanateli, B.M.; Alves, G.V.; Gonçalves, E.S.; Guedes, E. 2019. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. *Revista Agroveterinária do Sul de Minas*, 1(1):1–14.
- Pisseti, C.; Silva, A.P.S.P.; Neto, W.S.; Costa, E. de F. 2021. *Staphylococcus aureus* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos em mastites de gado leiteiro: uma meta-análise. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 4(1):772–788.
- Ribeiro, M.G. 2008. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia, p.759–771. In: Andrade S.F. (Ed.), *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3ª ed. Roca, São Paulo.
- Sá, T.A.P.; Neto, J.R.O.; Ribeiro, T.S.S. 2018. Métodos de Remoção do Antibiótico Amoxicilina em Solução via Hidrólise Ácida e Alcalina. *Revista Processos Químicos*, 12(23):25–32.
- Santos, W.B.R.; Oliveira, N.C.; Vieira, M.L.; Ribeiro, J.C.; Cezário, A.S.; Oliveira, E.M.B.; Camargos, A.S.; Valente, T.N.P. 2017. Mastite Bovina: Uma Revisão. *Colloquium Agrariae*, 13:301–314.
- Silva, B.R.; Ferreira, D.J.; Guimarães, G.M.; Silva, T.M.; Acurcio, T.O.R.; Acurcio, L.B. 2021. Caracterização da microbiota de urina de cães e sua suscetibilidade aos antimicrobianos. *PUBVET*, 15(9):1–6.
- Silva, J.R.; Vargem, D.S.; Santos, W.; Frutuoso, G.F.; Vieira, E.F.; Menezes, E.D. 2013. Inativação por hidrólise alcalina de antibióticos B-lactâmicos, cefalosporínicos e penicilâmicos. *Ensaio e Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 17(1):19–31.
- Silva, L.H.B.; Primieri, C. 2020. Mastite bovina: Revisão bibliográfica. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG*, 3(2):142–151.
- Tanikawa-Vergilio, K.L. 2020. *Terapia fotodinâmica antimicrobiana com fenotiazínicos: ensaios in vitro em staphylococcus aureus*. 73 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde) - Universidade Nove de Julho, São Paulo.
- Ulsenheimer, B.C.; Ziegler, S.J.; Viero, L.M.; Fraga, D.R.; Beck, C.; Martins, L.R.V. 2021. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Streptococcus uberis* isoladas de mastite bovina na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Development*, 7(3):22549–22557.