

Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis

Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity

Agueda Castagna de Vargas¹ Andrea Pinto Loguercio² Niura Mazzini Witt³
Mateus MatiuZZi da Costa⁴ Mariana Sá e Silva⁵ Luciane Ribeiro Viana⁵

RESUMO

A própolis é uma resina natural coletada e modificada por abelhas, que tem sido usada como agente quimioterápico desde a antiguidade. A ação antibacteriana desse composto foi avaliada através da inoculação de placas de ágar BHI, contendo 5% de extrato alcóolico de própolis a 50%, com um inóculo bacteriano de 1×10^6 células.mL⁻¹. Foram testados 161 isolados bacterianos, tanto gram positivos (*Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Nocardia asteroides* e *Rhodococcus equi*), como gram negativos (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os isolados foram considerados sensíveis ao extrato de própolis quando não ocorreu crescimento bacteriano na placa após 72 horas de incubação a 37°C. Utilizaram-se, como controle, meios acrescidos de 5% de álcool etílico e 5% de solução salina. O extrato de própolis demonstrou atividade antibacteriana por inibir o crescimento de 67,7% das bactérias testadas; 92,6% dos isolados Gram positivos e 42,5% dos Gram negativos foram sensíveis ao extrato. O extrato alcóolico de própolis a 50% avaliado foi capaz de exercer ação antibacteriana efetiva contra a maioria dos isolados testados.

Palavras-chave: flavonóides, atividade antibacteriana, sensibilidade.

ABSTRACT

Propolis is a natural resin collected and modified by honeybees. Since ancient times it has been used as a chemotherapeutic agent. The propolis antibacterial activity was evaluated through bacterial inoculation on BHI agar plates with 5% of alcoholic propolis extract (10^6 bacteria.

mL⁻¹). One hundred and sixty one bacterial strains were evaluated, as Gram positive bacteria (*Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Nocardia asteroides* and *Rhodococcus equi*) as Gram negative (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*). The strain was considered sensible to the propolis extract when no bacterial growth was evident on the plate after 72 hours at 37°C. The control test used agar plates with 5% of ethanol (M2) and 5% of saline solution. Propolis extract demonstrated antibacterial activity on 67.7% of the tested strains; 92.6% of Gram-positive and 42.5% of Gram-negative strains presented sensitivity. The propolis extract showed effective antibacterial activity against the majority of tested strains.

Key words: flavonoids, antibacterial activity, sensitivity.

INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa ou algumas vezes cerosa, coletada por abelhas melíferas de diferentes exsudatos vegetais. Tem sido utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade devido ao seu largo espectro de atividade biológica como antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antifúngico e, até mesmo, anti-cancerígeno (KUJUMGIEV et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000; SFORCIN et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001).

A composição da própolis varia de acordo com o local de coleta e da espécie vegetal utilizada pelas abelhas na sua confecção. Alguns componentes

¹Médico Veterinário, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Prédio 44, sala 5137, CCR, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS. E-mail: agueda@smail.ufsm.br. Autor para correspondência.

²Engenheiro Agrônomo, Mestre, Doutorando no Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGA), CCR, UFSM.

³Médico Veterinário, Fundação de Apoio à Tecnologia (FATEC), UFSM.

⁴Médico Veterinário, Mestrando no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. (PPGBIOT), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

⁵Acadêmico, curso de Medicina Veterinária, UFSM.

estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas. Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostras de própolis de origens diversas, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonóis, dihidroflavonóis, etc.), terpenos, β -esteróides, aldeídos e álcoois aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (GREENAWAY et al., 1991; AGA et al., 1994; BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1996, 2001).

Extratos etanólicos, hidro-alcóolicos e aquosos da própolis têm sido utilizados e estudados em diferentes situações como agentes antitripanosomais (MARCUCCI et al., 2001), em doenças pulmonares crônicas não específicas (MASTEROV & NERSESIAN, 1995), como cardioprotetores (CHOPRA et al., 1995), em ferimentos orais e da pele (ARVOUET-GRAND et al., 1993; MAGRO-FILHO & CARVALHO, 1994; PARK et al., 1998; KOO et al., 1999, 2000), no tratamento local de doenças reumáticas (SIRO et al., 1996), como agente anti-inflamatório (SOSA et al., 1997), anti-parasitário (MOURA et al., 1998), em doenças reprodutivas animais (SANTOS et al., 1999), como hepatoprotetor (BASNET et al., 1996; BANSKOTA et al., 1998) e antimicrobiano (AHMED et al., 1996; PARK et al., 1998; BANKOVA et al., 1999; SFORCIN et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001).

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos têm levado à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (CRISAN et al., 1995). O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antibacteriana "in vitro" da própolis em solução alcóolica a 50% sobre isolados bacterianos Gram positivos e negativos, oriundos de animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 161 isolados bacterianos liofilizados (81 Gram positivos e 80 Gram negativos),

provenientes da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria. Dentre os isolados Gram positivos, foram utilizados 46 de *Staphylococcus* sp., 21 de *Streptococcus* sp., cinco de *Rhodococcus equi* e nove de *Nocardia asteroides*; os isolados Gram negativos foram: 29 de *Pseudomonas aeruginosa*, nove de *Proteus mirabilis*, 22 de *Salmonella* spp. e 20 de *Escherichia coli*. As bactérias foram reconstituídas em água destilada estéril, semeadas em TSA (Tryptic Soy Agar) e as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Após a incubação, emulsionaram-se os inóculos em água destilada estéril, sendo a turvação ajustada à escala 1 de McFarland (300×10^6 bactérias . mL⁻¹). As suspensões bacterianas foram diluídas até obter-se um inóculo bacteriano equivalente a cerca de 1×10^6 células bacterianas . mL⁻¹ de suspensão.

A própolis foi obtida de apiários comerciais da região de Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. Preparou-se o extrato de própolis a uma concentração de 50% de própolis (p/v) em solução de álcool etílico 96°GL, segundo a metodologia de SWEWCZAK & GODOY (1984). O teste foi realizado com três tipos de meio de cultura, tendo como base o ágar BHI (Brain Heart Infusion) acrescido de 5% de própolis (M1), 5% de etanol 96°GL (M2) e 5% de solução salina (M3), os quais foram distribuídos em placas de petri e estocados em geladeira por, no máximo, uma semana e submetidos a controle de esterilidade antes do uso. Os tratamentos M2 e M3 consistiam nos controles negativo do veículo utilizado para extração e controle do inóculo bacteriano, respectivamente.

Para o teste de sensibilidade, fez-se a semeadura, com alça de drigalski, de 0,1mL da suspensão bacteriana contendo aproximadamente 1×10^6 bactérias.mL⁻¹ por placa, realizando-se duas repetições por tratamento. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 72 horas, dependendo da espécie bacteriana testada. Os isolados foram considerados sensíveis ao extrato de própolis, quando não ocorreu crescimento bacteriano nas placas após 72 horas de incubação a 37°C. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente de acordo com STELL & TORRIE (1980).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 161 amostras bacterianas avaliadas, 109 foram sensíveis ao extrato de própolis, o que representou 67,70% do total pesquisado. Todas as amostras cresceram nas placas cujo meio de cultura

foi acrescido de etanol (M2) e de solução salina (M3). Apresentaram sensibilidade ao extrato de própolis, 75 (92,60%) dos 81 isolados Gram positivos e 34 (42,50%) dos 80 Gram negativos avaliados, concordando com os achados de LANGONI et al. (1996) que encontraram percentuais de 96,70% de bactéria Gram positivas sensíveis ao extrato de própolis. Estes autores também observaram maior atividade do extrato sobre as bactérias Gram positivas, porém o perfil de sensibilidade encontrado para as Gram negativas foi maior (83,72%). De acordo com BANKOVA et al. (1999) e MARCUCCI et al. (2001), a atividade antibacteriana da própolis é maior contra as bactérias Gram positivas, devido aos flavonóides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina, os quais atuam sobre a estrutura da parede celular desses microrganismos através de um mecanismo de ação ainda não elucidado.

Analisando a atividade antibacteriana do extrato de própolis contra os gêneros bacterianos Gram positivos (Figura 1), observa-se que 100% dos isolados de *Nocardia asteroides* demonstraram-se sensíveis ao extrato, seguido do *Staphylococcus* sp. (97,83%), *Streptococcus* sp. (80,95%) e *Rhodococcus equi* (80%). Este elevado percentual de sensibilidade

do gênero *Nocardia* é muito significativo, pois em casos de mastite esta bactéria é geralmente refratária à terapia por agentes antimicrobianos sintéticos, mesmo apresentando sensibilidade nos testes "in vitro" (CARTER & CHENGAPPA, 1991; KHARDORI et al., 1993; BROWN-ELLIOT et al., 2001). As bactérias Gram negativas demonstraram percentual de resistência bem mais elevado quando comparadas às Gram positivas, sendo o maior percentual de sensibilidade o de *Pseudomonas aeruginosa* (72,41%). Nos demais gêneros, obteve-se sensibilidade de 33,30% para *Proteus mirabilis*, 25% para *Escherichia coli* e 22,72% para *Salmonella* sp. (figura 1). LANGONI et al. (1996) encontraram sensibilidade de 100% para isolados de *Staphylococcus aureus*, *Prototheca zopfii*, *Corynebacterium bovis*, *Rhodococcus equi* e *Enterobacter aerogenes*. Para os demais gêneros testados, os autores encontraram sensibilidade de 91% para *Escherichia coli*, 90% para *Streptococcus agalactiae*, 87,50% para *Klebsiella pneumoniae*, 85,70% para *Pseudomonas aeruginosa* e 81,30% para *Salmonella* sp. No entanto, BANKOVA et al. (1999) não encontraram nenhuma atividade antibacteriana de extrato de própolis sobre isolado clínico de *Escherichia*

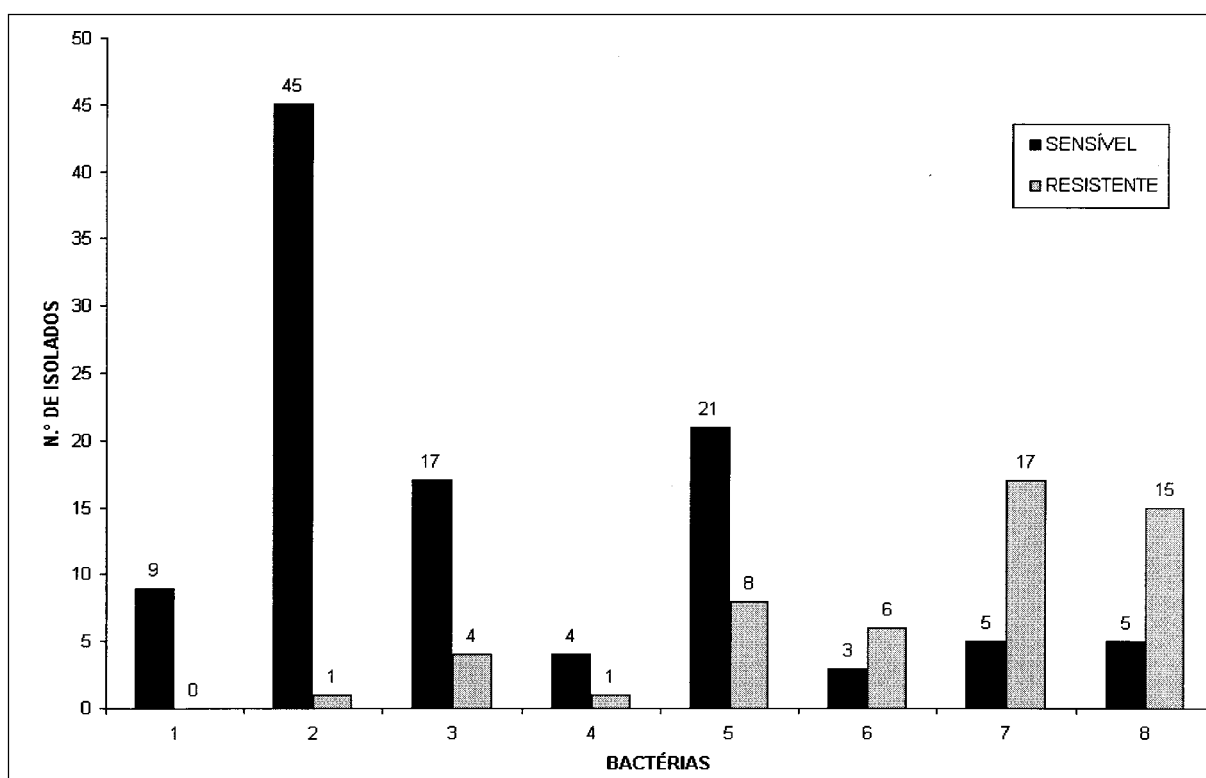


Figura 1 – Comportamento "in vitro" de diferentes isolados bacterianos ao extrato alcóolico de própolis a 50%. 1- *Nocardia asteroides*; 2- *Staphylococcus* sp.; 3- *Streptococcus* sp.; 4- *Rhodococcus equi*; 5- *Salmonella* sp.; 6- *Escherichia coli*; 7- *Proteus mirabilis*; 8- *Pseudomonas aeruginosa*.

coli, enquanto MARCUCCI et al. (2001), analisando diferentes frações de extrato metanólico de própolis, encontraram pouca ou nenhuma atividade sobre cepas-padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Até o presente, não se tem dados que respondam o porquê desta menor atividade dos extratos de própolis contra bactérias Gram negativas, no entanto, esses agentes, apesar de possuírem uma estrutura de parede celular menos rígida do que as Gram positivas, têm uma parede celular quimicamente mais complexa, sendo que um dos constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, é que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microrganismos. Além disso, esse grupo de bactérias possui um teor lipídico maior do que as Gram positivas. Tais características podem estar envolvidas com a maior resistência ao extrato testado.

Parece haver uma relação entre a atividade antibacteriana do extrato e a composição química da própolis, que varia de acordo com as espécies vegetais das quais a resina foi coletada (MILLER & LILENBAUM, 1988; BANKOVA et al., 1999; CHRISTOV et al., 1999; WESTON et al., 1999). Estudos posteriores que avaliem, comparativamente, própolis oriundas de diferentes locais e suas atividades contra diferentes gêneros bacterianos, podem auxiliar na elucidação de tal questão.

CONCLUSÕES

O extrato alcóolico a 50% de própolis apresenta atividade antibacteriana “in vitro”, inibindo o crescimento de 67,70% das amostras de *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas. As bactérias Gram positivas são mais sensíveis (92,6%) ao extrato testado do que as Gram negativas (42,5%). Dentre as bactérias avaliadas, *Nocardia asteroides* foi a bactéria Gram positiva mais sensível (100%) e *Pseudomonas aeruginosa* a Gram negativa que apresenta maior sensibilidade (72,41%) ao extrato de própolis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosci Biotechnol Biochem**, Tokio, v.58, n.5, p.945-946, 1994.
- AHMED, F. H. et al. Antimicrobial activity of bee glue (propolis) extracts. **Egypt J Microbiol**, Cairo, v.31, n.3, p.423-435, 1996.
- ARVOUET-GRAND, A. et al. Propolis extract. II. Wound healing in the rat and rabbit. **J Pharm Belg**, Paris, v.48, n.3, p.171-178, 1993.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**, Tübingen, v.50, n.3-4, p.167-172, 1995.
- _____. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, Milão, v.70, n.2, p.190-193, 1999.
- BANSKOTA, A. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **J Nat Prod**, Downers Grove, v.61, n.7, p.896-900, 1998.
- _____. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.72, n.1-2, p.239-246, 2000.
- BASNET, P. et al. Four di-o-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. **Biol Pharm Bull**, Tokio, v.19, n.11, p.1479-1484, 1996.
- BROWN-ELLIOT, B. et al. *In vitro* activities of linezolid against multiple *Nocardia* species. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.45, n.4, p.1295-1297, 2001.
- CARTER, G.R., CHENGAPPA, M.M. Rapid presumptive identification of type B *P multocida* from haemorrhagic septicaemia. **Vet Rec**, Kent, v.1, n.128, p.526, 1991.
- CHOPRA, S. et al. Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Exp Mol Pathol**, Orlando, v.62, n.3, p.190-198, 1995.
- CHRISTOV, R. et al. Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands propolis. **Fitoterapia**, Milão, v.70, n.1, p.89-92, 1999.
- CRISAN, I. et al. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Rom J Virol**, Bucareste, v.46, n.3-4, p.115-33, 1995.
- GREENAWAY, W. et al. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Z Naturforsch C**, Tübingen, v.46, n.1-2, p.111-121, 1991.
- KHARDORI, N. et al. *In vitro* antimicrobial susceptibilities of *Nocardia* species. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.37, n.4, p.882-884, 1993.
- KOO, H. et al. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res**, Basel, v.33, n.5, p.393-400, 1999.
- _____. et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.45, n.2, p.141-148, 2000.
- KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.64, n.3, p.235 - 240, 1999.

- LANGONI, H. et al. Efeito antimicrobiano "in vitro" da própolis. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v.48, n.2, p.227-229, 1996.
- MAGRO-FILHO, O.; CARVALHO, A.C. Topical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. Cytological and clinical evaluation. **J Nihon Univ Sch Dent**, Tokio, v.36, n.2, p.102-111, 1994.
- MARCUCCI, M. C.; DE CAMARGO, F. A.; LOPES, C. M. A. Identification of aminoacids in Brazilian propolis. **Z Naturforsch C**, Tübingen, v.51, n.1-2, p.11-14, 1996.
- _____. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.74, n.2, p.105-112, 2001.
- MASTEROV, G.D.; NERSESIAN, O.N. The role of apitherapy in the combined treatment of patients with chronic nonspecific lung diseases. **Lik Sprava**, Minneapolis, v.1, n.3-4, p.155-158, 1995.
- MILLER, A.F.; LILENBAUM, W. Própolis: avaliação da ação antibacteriana *in vitro*. **Ci Med**, Niterói, v.7, n.1-2, p.29 - 33, 1988.
- MOURA, L.P.P. et al. Effect of hydroalcoholic propolis solution and robenidin on the oocysts per gram of drops scores of *Eimeria* spp. in New Zealand white rabbits. **Rev Bras Zootec**, Viçosa, v.27, n.2, p.325-330, 1998.
- NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol**, São Paulo, v.31, n.2, p.247-256, 2000.
- PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr Microbiol**, New York, v.36, n.1, p.24-28, 1998.
- SANTOS, I. W. et al. Use of propolis in the treatment of the cow endometritis. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.23, n.3, p.439-441 1999.
- SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, Limerick, v.73, n.1-2, p.243-249, 2000.
- SIRO, B. et al. Local treatment of rheumatic diseases with propolis compounds. **Orv Hetil**, Budapeste, v.137, n.25, p.1365-1370, 1996.
- SOSA, S. et al. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbia activities of propolis. **Pharm Pharmacol Lett**, Berlim, v.7, n.4, p.168-171, 1997.
- STELL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. 2.ed. New York : McGraw Hill, 1980. 345p.
- SWEWCZAK, E.H.; GODOY, G.F. Estudo comparativo entre a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à própolis e a antibióticos. **Apicultura no Brasil**, São Paulo, v.3, n.17, p.28-29, 1984.
- WESTON, R.J.; MITCHELL, K.R.; ALLEN, K.L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chem**, Limerick, v.61, n.3, p.295-01, 1999.