

Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis testadas em cepas bacterianas padrão*(In vitro antibacterial activity of propolis tested in standard bacterial strains)*

SINHORINI, W.A.¹; BORDIN, J.T.²; VIGNOTO, V.K.C.³; CARDOZO, R.M.⁴; MARTINS, R.R.⁴; WOSIACKI, S.R.^{4*}

1- Aluno de Residência Médico-Veterinária em Patologia Clínica, Universidade Estadual de Maringá – UEM;

2- Aluno de Residência em Doenças Infecto-Contagiosas e Parasitárias, Universidade Estadual de Maringá – UEM;

3- Bióloga, técnica do Laboratório de Microbiologia Animal, Universidade Estadual de Maringá - UEM

3- Docentes em Medicina Veterinária, Universidade Estadual de Maringá – UEM

* wosiacki@yahoo.com.br / srwosiacki@uem.br

Artigo enviado em 01/07/2014, aceito para publicação em 26/10/2014.

RESUMO

Produto obtido das abelhas, a própolis, possui grande eficácia sobre agentes bacterianos patogênicos devido a sua vasta composição, que inclui, como agente principal, os flavonoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis frente a cepas bacterianas padrão. A ação antimicrobiana deste composto foi testada através da diluição da própolis, comercialmente vendida, em Agar Muller Hinton, para amostrar a percentagem em que o mesmo começa a fazer efeito inibitório a bactérias. Foram testados isolados bacterianos padrão (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, e *Escherichia coli*). Em algumas concentrações, 0,1% para *Streptococcus*, 0,25% para *S. aureus* e 3% para *Escherichia coli*, os isolados tiveram sensibilidade considerável ao extrato de própolis quando não ocorreu o crescimento de unidades formadoras de colônia na placa após um período de 24 horas de incubação a 37°C. Para controle, utilizaram-se meios de Agar Muller Hinton com álcool, nas mesmas concentrações das de própolis. A eficácia antibacteriana da própolis foi de 91% sobre a *Streptococcus pyogenes*; 80% sobre a *Staphylococcus aureus* e 61,6% sobre a *Escherichia coli*. Concluiu-se, portanto que as bactérias Gram positivas são mais susceptíveis a ação antibacteriana da própolis o que provavelmente, deve-se aos flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina, que atuam sobre a estrutura bacteriana da parede celular desses micro-organismos, através de um mecanismo de ação ainda não elucidado.

PALAVRAS-CHAVE: flavonoides, isolados bacterianos, própolis, sensibilidade.

ABSTRACT

Product obtained from bees, propolis, has great effectiveness on pathogenic bacterial agents due to its vast composition, which includes, as principal agent, the flavonoids. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity *in vitro* of propolis against standard bacterial strains. The action of this compound was tested by dilution of propolis in different concentrations in Muller Hinton Agar. Standard bacterial isolates were tested (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Escherichia coli*). In some concentrations, 0.1% to *Streptococcus*, 0.25% to *S. aureus* and 3% to *Escherichia coli*, isolates had considerable sensitivity to propolis extract did not occur when the growth of colony forming units on the plate after a 24-hour period of incubation at 37 ° C. As control, we used a means of Muller Hinton agar with alcohol at the same concentration of propolis. The antibacterial efficacy of propolis was 91% on *Streptococcus pyogenes*, 80 % of *Staphylococcus aureus* and 61,6% for *Escherichia coli*. It is therefore concluded that Gram positive bacteria are more susceptible to antibacterial action of propolis which probably is due to flavonoids, aromatic acids and esters present in the resin, which act on the bacterial cell wall structure of these microorganisms through a mechanism of action has not been elucidated.

KEY-WORDS: flavonoids, bacterial isolates, propolis, sensitivity.

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto de origem vegetal, proveniente de substâncias resinosas e

balsâmicas, de consistência viscosa e cor variada, fabricada por abelhas (*Apis mellifera* L.), utilizada para esterilizar e impermeabilizar a colméia. Sua

composição química é complexa, destacando-se os ácidos fenólicos e seus ésteres, flavonoides, terpenos, hidrocarbonetos e aminoácidos (MARCUCCI et al., 2001), e irá depender da origem do material coletado, refletindo a variedade de vegetação próxima à colmeia e a variabilidade genética da rainha. Fatores associados à técnica de extração, metodologia de condução de ensaios, local de origem e época do ano em que foi a própolis produzida podem influenciar o maior ou menor grau de inibição do produto em relação às diferentes espécies bacterianas (FUENTES e HERNANDEZ, 1990).

Sua ação estende-se em variáveis vertentes funcionais farmacêuticas, com ação microbiana ampla, além de funções anti-inflamatórias, citotóxicas, imunomodulares, antioxidante, anticariogênica e antitumoral, de amplo relato na literatura mundial (ALENCAR et al., 2007; BASIM et al., 2006; FERNANDES et al., 2006; HAYACIBARA et al., 2005; LATIF et al., 2005; MENEZES, 2005;).

A própolis é utilizada pelo homem há milênios especialmente na medicina oriental, devido a suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória (BANKOVA, 2005a; KOSALEC et al., 2005; ALENCAR et al., 2005; SIMÕES et al., 2008). Sugere-se atualmente que a atividade antimicrobiana possa estar associada ao alto conteúdo de substâncias do tipo flavonoides presentes na própolis (GRANGE; DAVEY, 1990). A utilização de medicamentos naturais no combate às doenças de humanos e animais representa uma importante ferramenta da população e neste contexto a própolis destaca-se como uma alternativa diante de suas atividades biológicas (Marcucci et al., 2001). A própolis, usada em várias partes do mundo com indicação de melhorar a

saúde e prevenir doenças (KADOTA et al., 2002; PEREIRA et al., 2002) é um remédio popular e está disponível em diversas apresentações farmacêuticas (CAPASSO e CASTALDO, 2002; SOARES et al., 2006).

Flavonóide, constituinte de maior importância da própolis, possui papel principal na ação antimicrobiana, juntamente com outros constituintes, biologicamente ativos, sendo os ácidos cinâmico e seus ésteres e os diterpenos, parceiros nas inúmeras funções do composto natural (LI, F. et al., 2008; SALATINO, A. et al., 2005).

As investigações sobre as propriedades antimicrobianas da própolis têm sido conduzidas fortemente na área médica e veterinária, tendo o produto demonstrado uma eficiente atividade bacteriostática e bactericida em relação a diversos gêneros de bactérias Gram positivas e Gram negativas. O efeito da própolis tem se revelado altamente inibitório para o crescimento de determinados gêneros bacterianos, tais como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Mycobacterium* spp., sendo parcialmente efetivo ou inativo em relação a outros gêneros como *Pseudomonas* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Salmonella* spp. (PRADO FILHO et al., 1962; GRANGE; DAVEY, 1990).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis frente a cepas bacterianas padrão.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá – UEM – Campus de Umuarama, PR. Utilizaram-se própolis vendidas comercialmente na região de Umuarama-PR, da Aphis Ilha®, produzida em Fraiburgo/SC, sendo sua diluição de

70% de própolis e 30% de álcool cereal; e os isolados bacterianos padrões foram as *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). A reconstituição destas, foi realizada em meio líquido de TSB (Tryptic Soy Broth), em uma proporção de 3 mL para cada disco bacteriano, incubados a 37°C por 4 horas.

Na primeira etapa foi semeado inóculo de 10^4 UFC de cada micro-organismo em Agar Muller Hinton nas concentrações de própolis de 1%, 5% e 10%, incubados a 37°C por 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A partir da avaliação da concentração de própolis de cada cepa bacteriana, foi realizada a 2ª etapa com concentrações de própolis de 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75% e 1% para a *Staphylococcus aureus*; 3%, 4%, 5%, 6%, 7% e 8% para *Streptococcus pyogenes* e 5%, 6%, 7%, 8% e 9% para *Escherichia coli*, realizadas também em triplicatas, semeados e incubados da mesma forma.

A terceira etapa foi realizada com as concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5% para *Staphylococcus aureus*; 0,1%, 0,5%, 1%, 2,5% e 5% para *Streptococcus pyogenes*; 2,5%, 5% e 7,5% para *Escherichia coli*.

Para o isolado bacteriano de *Escherichia coli*, foram realizadas mais duas etapas com concentrações de 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% e 8%; e de 2%, 2,5% e 3% de própolis.

Como controle, foram feitos, em todos os lotes, placas de Agar Muller Hinton acrescidas de álcool cereal, nas mesmas concentrações encontradas no extrato de própolis.

Os resultados foram analisados de forma descritiva da mesma forma em que a análise da eficácia do estudo, baseada nos resultados obtidos através de proporções, considerando as taxas de inibição de crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria das espécies bacterianas mostrou-se sensível à ação inibitória da própolis, porém elas são individualmente susceptíveis a diferentes concentrações do produto. Cada espécie bacteriana possui uma concentração, que determina a eficiência do produto.

Evidencia-se neste trabalho a grande sensibilidade de bactérias Gram positivas frente a própolis, mostrando sensibilidade já em concentrações de 0,1% para *Streptococcus* e 0,25% para *S. aureus*. Já em Gram negativas, observa-se sensibilidade bacteriana em concentrações mais elevadas, a partir de 3%.

De acordo com Bankova et al. (1999) e Marcucci et al. (2001), esta maior atividade da própolis sobre as bactérias Gram positivas, deve-se aos flavonoides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina, que atuam sobre a estrutura bacteriana da parede celular desses micro-organismos, através de um mecanismo de ação ainda não elucidado; confirmando portanto a melhor eficiência sobre as bactérias Gram positivas aqui testadas. Bankova et al. (2005) não encontraram nenhuma atividade antibacteriana do extrato de própolis sobre os isolados de *Escherichia coli*, e Marcucci et al. (2001), analisando diferentes frações de extrato metanólico de própolis, obtiveram pouca ou nenhuma atividade antibacteriana sobre as cepas padrão de *Escherichia coli*.

Vários fatores podem ser preponderantes sobre a maior resistência das bactérias Gram negativas da ação antibacteriana da própolis. Entre esses fatores estão: a maior concentração lipídica do grupo e uma parede celular quimicamente mais complexa do que as bactérias Gram positivas, com uma substância lipopolissacarídica, que determina

a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microorganismos.

CONCLUSÃO

A própolis vendida comercialmente, em concentração de 70% para 30% de álcool cereal, obteve um bom resultado contra as bactérias testadas, sendo sua eficiência demonstrada em concentração mais baixa do que as apresentadas no produto.

Evidencia-se neste trabalho a grande sensibilidade de bactérias Gram positivas frente a própolis, mostrando sensibilidade já em concentrações de 0,1% para *Streptococcus* e 0,25% para *S. aureus*. Já em Gram negativas, observa-se sensibilidade bacteriana em concentrações mais elevadas, a partir de 3%.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, L.; IKEGAKI, M.; Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis **Jornaul thnopharmacol.**, v. 113, p. 278, 2007.
- ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMÁN, J.P.; PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. **Ciência Rural**, v. 35, p. 909-915, 2005.
- BANKOVA, V et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v.70, n.2, p.190– 193, 1999.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 114-117, 2005.
- BASIM, E.; BAIM, H.; ZCAN, M.J. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 77, p. 992, 2006.
- CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. 1-6, 2002.
- FERNANDES, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, p. 94, 2006.
- FUENTES, A.M.O.; HERNANDEZ, N.R. Accion antimicrobiana de los extractos alcoholicos de propóleo. **Ver. Cubana. Farm.**, v. 24, p. 34-44, 1990.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p.159-160, 1990.
- HAYACIBARA, M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BOWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 101, p. 71, 2005.
- KADOTA, S.; BANSKOTA, A.H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L.Y.; TEZUCA, Y.; AWALE, S.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K. Antioproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal Ethnopharmacology**, v. 80, p. 67-73, 2002.
- KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm**, v. 55, p. 423-430, 2005.
- LANGONI, H. et al. Efeito antimicrobiano “in vitro” da própolis. **Arquivo Brasileiro Medicina**

Veterinária e Zootecnia, v. 48, n. 2, p. 227-229, 1996.

LATIF, M. M. M. A.; WINDLE, H. J.; HOMASANY, B. S.; SABRA, K.; BRAZ, J. Caffeic acid phenethyl ester modulates *Helicobacter pylori*-induced nuclear factor-kappa B and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. **Pharmacol.**, v. 146, p. 1139, 2005.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434–5440, 2008.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2001.

MENEZEZ, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas, **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 72, p. 405, 2005.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PRADO FILHO, L.G.; AZEVEDO, J.L.; FLECHTMANN, C.H. Antimicrobianos em própolis de *Apis mellifera* L. **Boletim da Indústria Animal**, v.20, p. 399-403, 1962.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D.; Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples Evidence-Basede Complementary. **Alternative Medicine**, v. 2, p. 33, 2005.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.; MAIA, A.B.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.; FARIAS L.M.; MOREIRA, E.S. Brazilian propolis:

physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens.

Phytotherapy research, v. 17, n. 3, p. 285-9, 2003.

SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.E.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos.

Revista Brasileira Farmacognosia, v. 18, p. 84-89, 2008.

SOARES, A.K.A.; CARMO, G.C.; QUENTAL, D.P.; NASCIMENTO, D.F.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis.

Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 447-454, 2006.