

ANÁLISE DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS E PADRONIZAÇÃO DE VOLUMES ATRAVÉS DE ANTIBIOGRAMA

ANALYSIS OF ANTIBACTERIAL ACTION OF PROPOLIS AND STANDARDIZATION OF VOLUMES THROUGH ANTIBIOGRAM

Thaís Vendramini MAGALHÃES¹; Rômulo Francis Estangari LOT²; Carlo Rossi DEL CARRATORE³.

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Marília – UNIMAR.

²Docente da disciplina de Microbiologia da Universidade de Marília – UNIMAR.

³Docente da disciplina de Fisiologia da Universidade de Marília – UNIMAR.

patdel@ig.com.br

RESUMO

Própolis, resina natural produzida pelas abelhas, é utilizada desde a antiguidade para o tratamento de muitas doenças, principalmente os processos inflamatórios. Com o avanço das medicinas naturais, têm-se direcionado um interesse cada vez maior para a própolis, testando suas propriedades antibacterianas, cicatrizantes, anestésica e anti-inflamatória. A própolis é elaborada pelas abelhas que coletam a matéria-prima de diversas partes das plantas como brotos, cascas e exsudatos de árvores, transformando-as dentro da colmeia pela adição de secreções salivares e cera. De acordo com os trabalhos realizados atualmente, a própolis mostrou-se positiva para a reorganização tecidual em nível superficial e ação anti-inflamatória, assim como ação antibacteriana, que é a mais investigada. As amostras de própolis que contém alto teor de flavonoides são relatadas por apresentarem atividade antimicrobiana, podendo haver um sinergismo entre os flavonoides e outros agentes bacterianos. Foram utilizados discos estéreis de antibiograma, contendo própolis sem álcool, com álcool a 30%, e um grupo controle utilizando apenas álcool a 30% em placas de petri com meio Mueller-Hinton. Bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, foram semeadas e cultivadas em ágar Sangue, ágar MacConkey, ágar Eosina Azul de Metileno e ágar Verde Brilhante respectivamente. Retirou-se, com alça de platina, uma colônia isolada de cada bactéria que foi transferida para um tubo de ensaio contendo ágar Nutriente (BHI). Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por 24-48 horas. Após o crescimento das respectivas bactérias, semeou-se na placa contendo ágar Mueller-Hinton juntamente com o disco estéril para antibiograma contendo a própolis no centro da placa. Foram feitos testes com discos embebidos na própolis, outros com 20, 40 e 60 microlitros, utilizando pipetas graduadas, de ambas as própolis: com álcool e sem álcool. A própolis sem álcool demonstrou atividade antibacteriana com 60 microlitros e embebida no disco estéril de antibiograma, já a própolis alcoólica inibiu o crescimento bacteriano em todas as proporções demonstrando halo de inibição maior em torno do disco de acordo com o aumento do volume. Paralelamente, a utilização de solução alcoólica a 30% livre de extrato de própolis não demonstrou efeito antimicrobiano nos agentes avaliados. Desse modo, a própolis atua na inibição do crescimento de bactérias comensais gram-positivas e gram-negativas, sendo o álcool, um potencializador do efeito antimicrobiano.

Palavras-chave: Antibacteriana. Própolis.

ABSTRACT

Propolis, a natural resin produced by bees, has been used since antiquity to treat many diseases, especially inflammatory processes. With the advancement of natural medicines, an increasing interest has been directed towards propolis, testing its antibacterial, healing, anesthetic and anti-inflammatory properties. Propolis is made by bees that collect the raw material from various parts of plants such as sprouts, barks and tree exudates, transforming them into the hive by the addition of salivary secretions and wax. According to the present work, propolis was positive for tissue reorganization at the superficial level and anti-inflammatory action, as well as antibacterial action, which is the most investigated. Samples of propolis containing high flavonoid content are reported as having antimicrobial activity, and there may be synergism between flavonoids and other bacterial agents. Sterile antibiogram discs containing alcohol-free propolis with 30% alcohol were used and a control group using only 30% alcohol in petri dishes with Mueller-Hinton medium. Bacteria of the genus Staphylococcus, Streptococcus, Escherichia coli and Salmonella, were sown and cultured on Blood agar, MacConkey agar, Methylene Blue Eosin agar and Bright Green agar respectively. A colony isolated from each bacterium was transferred with platinum handle and transferred to a test tube containing Nutrient Agar (BHI). The tubes were incubated in an oven at 37 ° C for 24-48 hours. After growth of the respective bacteria, it was seeded in the plate containing Mueller-Hinton agar together with the sterile disk for antibiogram containing the propolis in the center of the plate. Tests were carried out with discs embedded in propolis, others with 20, 40 and 60 microliters, using graduated pipettes, of both propolis: with alcohol and without alcohol. Non-alcoholic propolis demonstrated antibacterial activity with 60 microliters and embedded in the sterile disc of antibiogram, whereas alcoholic propolis inhibited bacterial growth in all proportions demonstrating greater inhibition halo around the disc according to the increase in volume. In parallel, the use of alcoholic solution at 30% free of propolis extract did not demonstrate an antimicrobial effect in the evaluated agents. Thus, propolis acts to inhibit the growth of gram-positive and gram-negative commensal bacteria, with alcohol being a potentiator of the antimicrobial effect.

Keywords: Antibacterial. Propolis.

INTRODUÇÃO

Sob a forma de extratos hidroetanólicos, a própolis vem se destacando pelas suas propriedades terapêuticas, tais como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica e anticariogênica. É amplamente utilizada sendo encontrada em várias preparações farmacêuticas e cosméticas tais como: pastilhas, pastas de dente, comprimidos, gomas de mascar, loções, cremes faciais, tinturas, pomadas, soluções para bochecho, spray para garganta, cápsulas, desodorantes e shampoos. Entretanto, a característica de várias atividades biológicas atrapalha sua aceitação, já que os médicos e outros profissionais tendem a desconfiar de sua eficácia devido a lhe serem atribuídas dezenas de atividades simultaneamente (MANARA, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002; ADELMANN, 2005).

A palavra própolis se originou do grego e significa “em defesa de” e polis “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colmeia. As abelhas usam esta substância para protegê-las contra insetos e microrganismos empregando-as em finas camadas nas paredes internas das colmeias, para vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel e proteger a entrada da colmeia (BURDOCK, 1998; BANKOVA *et al.*, 2000).

A própolis é um material resinoso de consistência viscosa elaborado pelas abelhas que coletam matéria-prima de diversas partes de plantas como brotos, cascas e exsudatos de árvores, transformando-as dentro da colmeia pela adição de secreções salivares e cera. A sua composição química é bastante complexa, e foi pioneiramente revelada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), o que permitiu a detecção de mais de 150 componentes (GREENAWAY, 1991; BURDOCK, 1998).

Os principais compostos da própolis são flavonóides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), os ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os

ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros em pequenas quantidades. Os compostos fenólicos são de extrema importância na composição da própolis e se caracterizam pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. Estas substâncias são representadas pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, os quais são responsáveis pela bioatividade contra vários microrganismos patogênicos (BURDOCK, 1998; ROCHA *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2005).

O efeito da própolis tem se revelado altamente inibitório para determinados gêneros, tais como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Mycobacterium*, existindo suposições de que a atividade antibacteriana possa estar associada ao alto conteúdo de substâncias do tipo flavonóides presentes em sua composição (PRADO FILHO *et al.*, 1962; GRANGE e DAVEY, 1990).

Alguns fatores associados à técnica de extração da própolis, sua metodologia de condução de ensaios, local de origem e época do ano em que foi produzida podem ter influência sobre o maior ou menor grau de inibição do produto em relação às diferentes espécies bacterianas (SHUB *et al.*, 1978; FUENTES e HERNANDEZ, 1990; BIANCHINI, 1997).

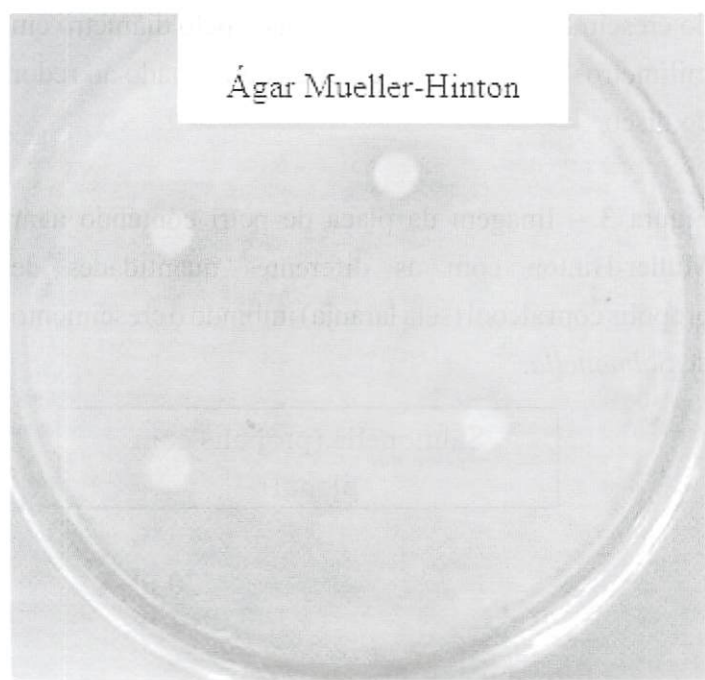
OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar a ação antibacteriana da própolis comercial padronizando sua quantidade através do antibiograma utilizando discos estéreis, buscando assim, uma introdução da mesma na rotina ambulatorial para o tratamento de feridas induzidas por microrganismos, assim como na cicatrização de lesões cutâneas ulceradas, principalmente se associada a antibióticos, proporcionando melhor eficiência clínica.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Universidade de Marília - UNIMAR, no município de Marília/SP. Foram utilizados discos estéreis de antibiograma, contendo própolis sem álcool, com álcool a 30%, e um grupo controle utilizando apenas álcool para a 30% em placas de petri com meio Mueller-Hinton. Em cada placa foram colocados quatro discos com as diferentes concentrações (Figura 1).

Figura 1 – Imagem fotográfica ilustrando a Placa de Petri contendo o meio Mueller-Hinton e discos estéreis de antibiograma.



Fonte: Magalhães, 2016.

Foram semeadas e cultivadas bactérias do gênero *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*. As bactérias foram semeadas em ágar Sangue e em ágar MacConkey, após as respectivas identificações, foram utilizados meios seletivos para os agentes Gram negativos, como o ágar Eosina Azul de Metileno e ágar Verde Brillante.

O Ágar Sangue é um meio de cultura de base rica, acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Fornece condições de crescimento para a maioria dos

microrganismos, e a conservação dos eritrócitos íntegros favorece a percepção de hemólise. O Ágar MacConkey, bastante utilizado para os organismos que fermentam lactose produzindo pH localizado, o qual, seguido pela absorção do vermelho neutro contido no meio, confere uma coloração vermelha ou rósea à colônia, enquanto que colônias não fermentadoras de lactose permanecem incolores ou transparentes. Bastonetes Gram-positivos têm seu crescimento inibido pelos sais biliares e pelo cristal violeta.

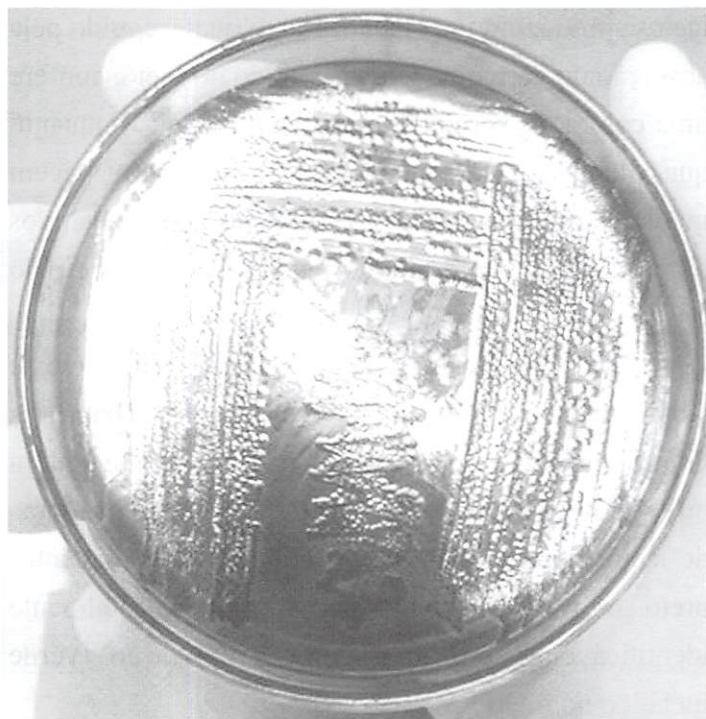
Já o ágar Eosina azul de metileno, é um meio de cultura diferencial que inibe o crescimento de bactérias Gram positivas e indica se a bactéria é fermentadora ou não de lactose. Bactérias fermentadoras de lactose apresentam-se em colônias com o centro preto. As colônias de *Escherichia coli* são facilmente identificáveis por apresentarem coloração verde metálico no meio EMB.

E por fim o ágar Verde Brillante, possuindo o extrato de levedura e duas peptonas, fornece os nutrientes. A lactose e a sacarose, juntamente com o vermelho de fenol, fornecem um sistema de diferenciação que exclui os fermentadores da lactose ou sacarose, como é o caso da *Escherichia coli*.

Para a realização da semeadura, uma colônia isolada de cada bactéria foi retirada com alça de platina e colocada em um tubo de ensaio com ágar nutriente, o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). O caldo BHI é utilizado na recuperação de microrganismos fastidiosos ou não, incluindo bactérias aeróbicas, anaeróbicas e fungos. Ele possui em sua formulação peptona e infusão cérebro-coração que servem de fonte de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas.

Os tubos de ensaio contendo as bactérias foram incubados em estufa a 37°C por 24 a 48 horas. Após o crescimento de todas as bactérias, foi feita a identificação de cada uma delas, utilizando as características das placas, provas de oxidase e catalase, triagem bioquímica para as bactérias Gram negativas e bacterioscopia após a coloração de Gram (Figura 2).

Figura 2 – Imagem do Ágar Verde Brillante demonstrando coloração característica do crescimento da bactéria *Escherichia coli*.



Fonte: Magalhães, 2016.

As bactérias, depois de identificadas, foram semeadas em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton juntamente com o disco estéril para antibiograma contendo a própolis.

O Ágar Mueller-Hinton é um meio de cultura recomendado para a realização de antibiograma pela técnica de difusão de discos, possuindo uma fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados de cálcio e magnésio, evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência.

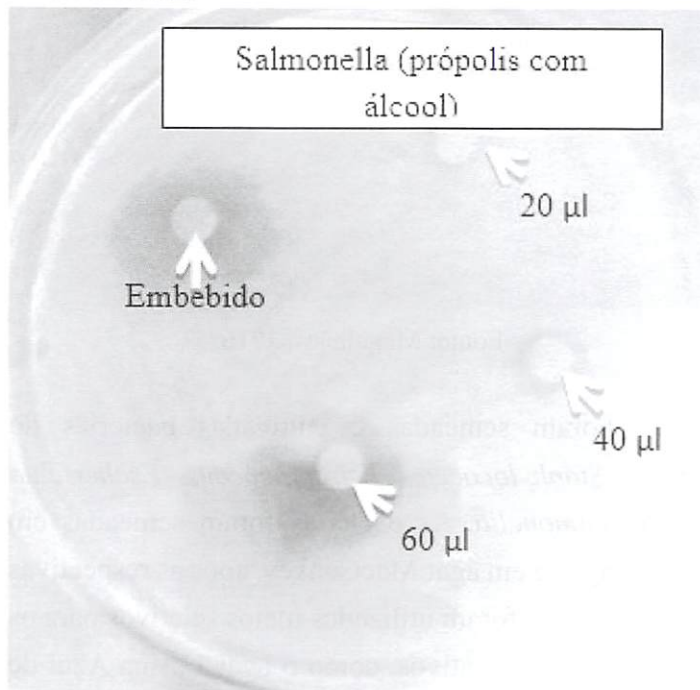
Os testes foram feitos em diferentes quantidades de própolis para avaliar a concentração juntamente com seu grau de inibição bacteriana. Os discos foram divididos em quatro grupos, sendo o primeiro grupo embebido na própolis, o segundo com 60 microlitros (μl), o terceiro grupo com 40 μl e o quarto com 20 μl . As mensurações foram feitas utilizando pipetas graduadas, de ambas as própolis, com álcool a 30% e sem álcool, além de um grupo controle utilizando apenas álcool

a 30%. As placas contendo os discos foram levadas à estufa a 37°C por 24 a 48 horas para que houvesse o crescimento bacteriano. Para a realização do experimento, utilizou-se própolis comercial a 30% com a finalidade de avaliar o efeito de um produto de fácil acesso.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A própolis sem álcool demonstrou atividade antibacteriana com o disco estéril de antibiograma embebido e com 60 μl , já a própolis alcoólica inibiu o crescimento bacteriano em todas as proporções demonstrando halo de inibição maior em torno do disco de acordo com o aumento de seu volume. A inibição do crescimento bacteriano é avaliada pelo diâmetro em milímetros (mm) do halo de inibição formado ao redor do disco.

Figura 3 – Imagem da placa de petri contendo ágar Muller-Hinton com as diferentes quantidades de própolis com álcool (seta laranja) inibindo o crescimento de *Salmonella*.

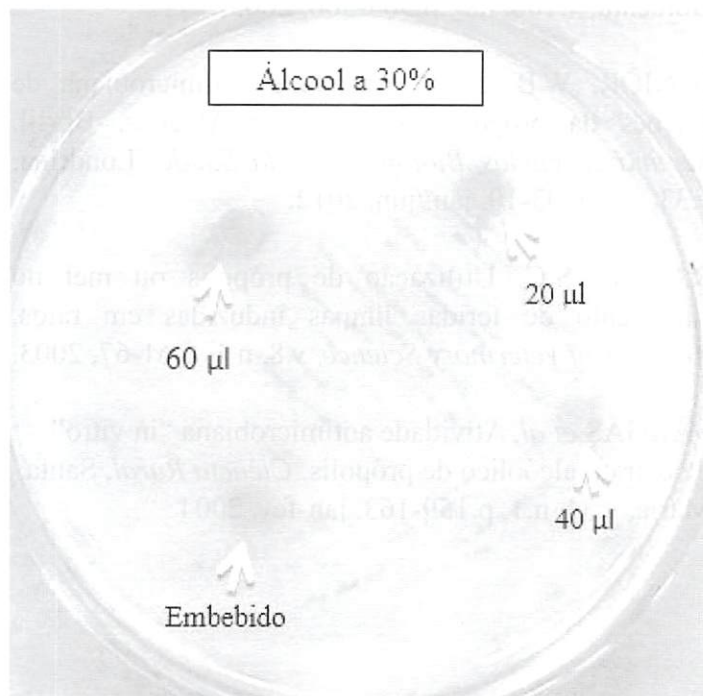


Fonte: Magalhães, 2016.

Paralelamente, a utilização de solução alcoólica a 30% livre de extrato de própolis não demonstrou

efeito antimicrobiano nos agentes avaliados (Figura 4).

Figura 4 – Imagem da placa de petri contendo ágar Muller-Hinton com as diferentes quantidades de álcool a 30% (setas laranja) para avaliação do crescimento de *Escherichia coli*.



Fonte: Magalhães, 2016.

De modo geral, a própolis alcóolica inibiu o crescimento tanto das bactérias Gram positivas quanto das Gram negativas. A própolis sem álcool inibiu o crescimento bacteriano de maneira muito discreta somente nas bactérias Gram positivas: *Staphylococcus* e *Streptococcus*, mostrando-se menos potente quando relacionada à própolis alcóolica, e não demonstrando efeito nas bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* e *Salmonella* confirmando resultados encontrados no experimento de Fernandes Junior *et al.* (2007), onde avaliou a atividade antibacteriana da própolis produzida em três regiões diferentes do Brasil utilizando *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e constatou que a atividade antibacteriana é maior para bactérias Gram positivas. Em outro estudo, observou-se uma predileção para inibição das bactérias *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Escherichia coli*, não sendo possível observar preferência sobre a formatação da parede celular bacteriana, não havendo maior

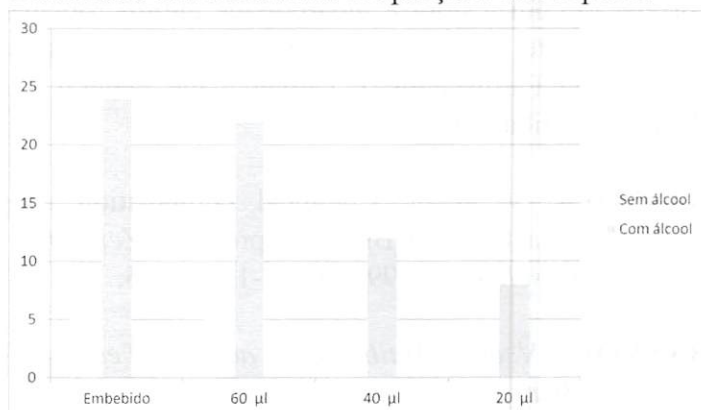
destaque de inibição ou ausência total de um modelo bacteriano, seja ele Gram positivo ou Gram negativo (PORTILHO *et al.*, 2013).

Segundo Bankova *et al.* (1999), 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 por mecanismos ainda desconhecidos. As bactérias Gram negativas possuem uma parede celular quimicamente mais complexa, sendo que um dos constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, é que determina a patogenicidade desses microrganismos.

Já o álcool a 30% não demonstrou efeito antibacteriano, e segundo Bankova *et al.* (2000), a atividade antimicrobiana da própolis está relacionada à presença de fenóis e polifenóis, substâncias aromáticas das quais derivam as flavonas, flavonoides e flavonóis que tem ação sobre a parede celular bacteriana. Quanto aos diferentes resultados sobre a inibição da própolis encontrados na literatura, deve-se levar em consideração os tipos utilizados e onde são encontrados. A hipótese para estes resultados divergentes seria a diferença na composição que a própolis poderia vir a ter devido a fatores climáticos, ambientais e sazonais (PACKER, 2007).

Os halos de inibição bacteriana foram medidos em milímetros para que houvesse uma comparação entre a própolis alcóolica e a própolis sem álcool. Os resultados são mostrados abaixo no gráfico 1.

Gráfico 1 – Média de Inibição do Crescimento Bacteriano nas Diferentes Proporções da Própolis.



Fonte: Magalhães, 2016.

Os números à esquerda representam o tamanho dos halos formados ao redor dos discos estéreis de antibiograma medidos em milímetros. Quanto maior o halo, maior o grau de inibição bacteriana.

Os resultados obtidos indicaram um maior grau de inibição bacteriana conforme o aumento da concentração de própolis, corroborando com os resultados de Bianchini *et al.* (1998), que obteve inibição bacteriana quando utilizado uma maior concentração da mesma. Segundo estudos histológicos de feridas limpas tratadas com própolis, o tratamento reduz a resposta inflamatória, havendo reepitelização mais rápida (RAHAL, 2003). O percentual de inibição das bactérias Gram positivas foi bastante alto, concordando com os resultados obtidos por Langoni *et al.* (1996), que encontraram percentuais de 96,70% de bactéria Gram positivas sensíveis ao extrato de própolis e Vargas *et al.* (2004) que chegou ao percentual de 92,60%.

CONCLUSÃO

A própolis é capaz de atuar na inibição do crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo o álcool, um potencializador do efeito antimicrobiano. As bactérias Gram positivas são significativamente mais inibidas pela própolis mesmo sem álcool, devendo assim, ser ainda mais estudada buscando a sua aplicação na rotina médica veterinária.

REFERÊNCIAS

ADELMAN J. *Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante*, 2005. 176f. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BANKOVA, V. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, v.1995, p.167-172, 1995.

BANKOVA, V. *et al.* Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, v.70, p.190-193, 1999.

BIANCHINI, L. *et al.* Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Sci. agric.* v.55 n.1, Piracicaba Jan./Apr. 1998.

FERNANDES JUNIOR, A. *et al.* Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Botucatu, v.100, n.5, p.563-566, 2005.

JUNIOR, W.B. *et al.* Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v.33, n.1, p.03-10, jan./jun. 2012.

RAHAL, S.C. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. *Archives of Veterinary Science*, v.8, n.1, p.61-67, 2003.

VARGAS *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, jan-fev, 2004.