

Comunicação

[Communication]

Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*

[Physico-chemical indicators and antibacterial activity of brown propolis against *Escherichia coli*]

E.M.A.F. Bastos¹, C. Galbiati², E.M. Loureiro², D.O. Scoaris¹

¹Fundação Ezequiel Dias
Rua Conde Pereira Carneiro, 80
30510-010 – Belo Horizonte, MG

²Universidade do Estado de Mato Grosso – Cáceres, MT

A busca, na biodiversidade, por recursos genéticos e bioquímicos que possam ser transformados ou contenham moléculas bioativas com potencial atividade terapêutica tem sido alvo de intensas investigações há tempos. Embora essas pesquisas contemplem principalmente a atividade biológica de produtos vegetais, outras substâncias, como a própolis, têm conquistado espaço de relevância.

Essa substância, resinosa, é produzida pelas abelhas a partir de exsudatos resinosos de diversas partes das plantas. Esses constituintes são biotransformados pela adição de cera e pela ação da enzima 13-glicosidase, produzida nas glândulas salivares das abelhas, que a depositam nas colmeias, onde tem papel importante para vedar frestas, manter a temperatura interna estável, recobrir o corpo de animais mortos dentro da colmeia e protegê-la contra proliferação de microrganismos (Ghisalberti, 1979).

A composição exata da própolis varia de acordo com a região, a planta fornecedora de resina e a espécie de abelha coletora, refletindo na diversidade de atividades biológicas apresentadas pelo produto (Ghisalberti, 1979). A constituição química básica é uma mistura de substâncias bioativas – ceras, resinas, bálsamos, óleos essenciais e pólen – e outros compostos, como ácido cinâmico, compostos fenólicos e flavonoides, terpenos, ácidos aromáticos,

derivados do ácido cafeico, ácidos graxos e aminoácidos. Sua coloração é dependente da origem botânica e pode variar desde a amarelo-esverdeada, passando por várias tonalidades de marrom até atingir a preta (Bastos, 2001).

Até o momento, inúmeras atividades biológicas já foram atribuídas à própolis: atividade hepatoprotetora, antitumoral, imunomoduladora, regenerativa, cicatrizante, anestésica e anti-inflamatória. Mas, reconhecidamente, a atividade biológica mais relevante é a antimicrobiana, sendo atribuída à presença de compostos flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres (Marcucci *et al.*, 2001). A atividade antibacteriana *in vitro* já foi evidenciada frente a várias linhagens de bactérias Gram-positivas e negativas (Marcucci *et al.*, 2001; Silici e Kutluca, 2005; Popova *et al.*, 2009), incluindo bactérias anaeróbicas da cavidade oral (Santos *et al.*, 2002) e de interesse veterinário (Bastos *et al.*, 2008), com destaque na inibição de Gram-positivos.

Um representante Gram-negativo de grande interesse clínico é a espécie *Escherichia coli*. Descrita pelo médico austríaco Theodor Escherich, em 1885, este bacilo flagelado, anaeróbico facultativo é membro normal da microbiota gastrointestinal de animais homeotérmicos. No entanto, algumas cepas, denominadas de *E. coli* diarreiogênicas, são capazes de desencadear infecções intestinais por diferentes mecanismos. Outras cepas podem

ainda causar infecções extraintestinais, sendo a espécie *E. coli* o principal microrganismo implicado em casos de infecções urinárias e um dos três de maior ocorrência em infecções hospitalares (Tortora et al., 2005).

Pela representatividade clínica, há atualmente uma vasta gama de antimicrobianos destinados ao tratamento de infecções intestinais e extraintestinais causadas por *E. coli*. Paralelamente, o uso indiscriminado e prolongado destes agentes tem levado à seleção de microrganismos resistentes, tornando a utilização de produtos naturais uma alternativa terapêutica viável. As pesquisas com própolis no Brasil concentram-se em amostras de própolis verde e, até o momento, não há relatos da atividade antibacteriana da própolis marrom frente à *E. coli*.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extrato de própolis marrom frente à *Escherichia coli*, relacionando-a aos indicadores de qualidade físico-químicos.

Foram analisadas 23 amostras de própolis marrom, provenientes da região sudoeste do estado de Mato Grosso, Brasil, entre as coordenadas 16° 00' 02'' S e 57° 39' 55'' W e 16°04' 55''S e 57° 37' 25''W. Nos referidos locais, a própolis foi coletada entre agosto de 2007 e julho de 2008, com coletor de própolis inteligente (CPI). Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos com vedação, identificadas e enviadas para análise em laboratório. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até o início das análises laboratoriais.

Os ensaios microbiológicos e físico-químicos foram realizados com extratos etanólicos de própolis. Para a produção destes, alíquotas de 50g de própolis bruta foram adicionadas a 100mL de álcool etílico 70% PA, sendo mantidas sob maceração, ao abrigo de luz, por 14 dias. Após este período, as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo e armazenadas em frascos âmbar, à temperatura ambiente. A avaliação dos indicadores de qualidade físico-química das amostras de própolis contemplou os seguintes parâmetros: determinação de extrato seco, conteúdo de cera, índice de oxidação e determinação quantitativa de compostos

fenólicos e flavonoides, segundo a metodologia descrita por Bastos (2001).

A atividade antibacteriana foi avaliada frente ao microrganismo *Escherichia coli* ATCC 25922, isolado clínico padrão, proveniente do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS - FIOCRUZ. A cepa foi mantida em tubos de ágar Mueller Hinton (AMH) inclinado, a 4°C, com subculturas (repiques) periódicas a cada 15 dias. A cada dois repiques, a cepa foi substituída por uma nova cultura, mantida sob congelamento.

Após a ativação da bactéria em caldo Mueller Hinton, foi preparada uma suspensão a $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (suspensão padrão), correspondente à turbidez da escala de MacFarland 0,5. Foram realizadas duas diluições seriadas 1:10 para obter, assim a suspensão de trabalho a 1×10^6 UFC/mL. Com auxílio de cotonetes esterilizados, a suspensão foi inoculada nas placas de AMH, em três direções, como padronizado pelo CLSI M2-A8 (Padronização..., 2003), com modificações. Após a completa absorção do inóculo pelo ágar, este foi perfurado com ponteiras de 200uL, estéreis e invertidas, obtendo-se poços de 7mm. Aos poços, foram adicionados discos de papel (blank disc), e, sobre estes, inoculados 40µL dos extratos. As placas foram deixadas em repouso até a completa absorção do extrato pelo ágar. Em seguida, foram incubadas de forma invertida, a 37°C, por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata, e a atividade antimicrobiana foi considerada positiva quando detectado o desenvolvimento de halo de inibição circundando o poço contendo as diferentes amostras de extrato de própolis. Os halos foram medidos com paquímetro. Como controle, foram empregados discos do antibiótico ampicilina (10µg, Sensifar).

Para determinar a concentração inibitória mínima com potencial atividade antibacteriana, os extratos foram submetidos à concentração em estufa a 40°C, até que o solvente fosse evaporado. Os extratos concentrados foram ressuspendidos em etanol 70%, à concentração de 1000mg/mL. A partir da concentração inicial, foram realizadas diluições seriadas 1:2 em etanol 70%, obtendo-se as concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25mg/mL. As diferentes

Indicadores físico-químicos...

concentrações de cada extrato foram avaliadas frente à cepa teste, como descrito anteriormente, e as amostras foram consideradas ativas quando evidenciados halos de inibição maiores ou iguais a 10mm.

A composição química da própolis, influenciada pela localização geográfica, pela origem botânica, pelo clima e pela composição do solo, reflete na atividade biológica deste produto

natural. A determinação de extrato seco, parâmetro que quantifica a porcentagem de sólidos solúveis extraídos da própolis, apresentou valores entre 2,6 e 27,6%, sendo tanto maior quanto maiores os halos de inibição observados (Tab. 1). Para as amostras ativas, a porcentagem de extrato seco esteve compreendida entre 17,1 e 27,6%, semelhante aos resultados obtidos para a própolis verde (Bastos, 2001; Pardo, 2007).

Tabela 1. Indicadores de qualidade físico-química e atividade antibacteriana de amostras de própolis do Mato Grosso, MT, frente à *Escherichia coli* ATCC 25922

Amostras de própolis	Porcentagem de extrato seco (%)	Índice de oxidação (s)	Porcentagem de cera (%)	Índice de fenólicos (p/p)	Índice de flavonoides (p/p)	Atividade antibacteriana* (mm)
1	4,1	5'02"	15,04	0,1	0,02	-
2	27,58	29"	29,65	0,2	0,08	11,33
3	4,43	6'07"	15,94	0,1	0,03	-
4	5,73	8'39"	31,81	4,5	0,35	-
5	22,02	8"	18,96	0,3	0,03	8,66
6	4,2	8'16"	18,95	0,8	0,04	-
7	23,01	11'	4,14	3,4	0,36	11,33
8	3,74	5'53"	24,04	0,6	0,05	-
9	18,1	15"	3,42	4,9	0,4	10,33
10	6,87	6'36"	24,75	0,4	0,03	-
11	19,6702	9"	4,98	3,9	0,32	8
12	2,63	5'52"	32,85	0,4	0,05	-
13	17,7	13"	10,18	5,0	0,66	10,66
14	4,93	7'09"	70,07	0,2	0,02	-
15	17,13	6"	37,91	4,4	0,61	10,66
16	5,75	9"	67,07	0,2	0,03	-
17	22,51	7"	33,67	3,7	0,34	10
18	3,4	8'17"	68,34	0,2	0,02	-
19	25,22	3"	17,54	4,8	0,44	11,3
20	2,97	5'30"	74,58	0,4	0,04	-
21	26,69	3"	30,22	5,5	0,52	9
22	3,77	7'13"	72,54	0,4	0,03	-
23	25,8	3"	21,03	4,3	0,47	9,3
Legislação	Mín. 11% (p/v)	Máx. 22 s	Máx. 1% ES	Mín. 0,25 % (p/p)	Mín. 0,50 % (p/p)	-

Os índices de oxidação observados também apresentaram grande variação, entre três e 519 segundos, sendo este tanto menor quanto maior a porcentagem de extrato seco, exceto para a amostra 16, que, embora tenha apresentado baixo índice de oxidação, apresentou porcentagem de extrato seco de 5,7%. Para as amostras ativas, os índices observados variaram de três a 29 segundos (Tab. 1), e apenas 14,3% destas apresentaram índices maiores que o preconizado

pela legislação brasileira, que é de 22 segundos (Brasil, 2001). Para a própolis verde, há relação direta entre os índices de oxidação e a quantificação de compostos fenólicos e flavonoides, o que não foi observado para a própolis marrom avaliada neste trabalho, de origem botânica ainda não determinada. O índice de oxidação da própolis infere sobre a idade e o armazenamento deste produto, sendo tanto maior

quanto maiores a temperatura e o período de armazenamento (Asis, 1989).

A cera é produzida pelas abelhas e acrescentada à resina coletada das plantas para a produção da própolis. Segundo a legislação vigente, o limite máximo de cera em extrato de própolis é de 1% do valor de extrato seco. Todas as amostras avaliadas apresentaram porcentagem de cera acima do limite estabelecido, com valores entre 3,4 e 74,6%, sendo possível detectar atividade antibacteriana positiva em amostras com até 37,91% de cera em sua composição. A alta porcentagem de cera nas amostras de própolis marrom do estado do Mato Grosso é uma característica diferencial entre esta e outras própolis já estudadas (Bastos, 2001).

Na composição química básica da própolis, figuram numerosos compostos fenólicos, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos, sendo estes últimos os mais abundantes em amostras de própolis verde (Marcucci *et al.*, 2001). Nas amostras de própolis marrom, os valores de fenólicos e flavonoides estiveram compreendidos entre 0,1 e 5,0 (p/p) e 0,02 e 0,66 (p/p), respectivamente. Uma vez que a atividade antioxidativa da própolis é atribuída aos compostos fenólicos, foi possível observar correlação negativa entre compostos fenólicos e índice de oxidação.

A atividade antimicrobiana da própolis está intimamente relacionada à sua composição

química. No presente estudo, das 23 amostras de própolis avaliadas, sete (30,4%) apresentaram potencial atividade antibacteriana para *Escherichia coli*, com halos de inibição entre 10 e 11,3mm, sendo possível observar que quanto maior o índice de compostos fenólicos, maiores os halos de inibição para as amostras consideradas ativas (Tab. 1). Para as sete amostras ativas, a CIM foi determinada, sendo esta considerada a concentração correspondente a halos de inibição com valores maiores ou iguais a 10,0mm. As concentrações inibitórias mínimas variaram de 125 a 1000mg/mL. As amostras 2 e 19 apresentaram CIM de 1000mg/mL; a amostra 9, de 500mg/mL; as amostras 13, 15 e 17, de 250mg/mL e apenas a amostra 7 apresentou CIM de 125mg/mL para *E. coli*. O controle positivo apresentou halos de inibição de 16mm.

O presente trabalho contribui para o estabelecimento de parâmetros físico-químicos que poderão ser utilizados na regulamentação da própolis marrom produzida no estado do Mato Grosso. A atividade antibacteriana significativa destas amostras frente à *Escherichia coli*, importante patógeno Gram-negativo, permite indicar uma possível aplicação terapêutica no desenvolvimento de novas formulações para o tratamento de infecções causadas por *E. coli*.

Palavras-chave: abelha, própolis, atividade antibacteriana, indicadores físico-químicos, *Escherichia coli*

ABSTRACT

The activity of 23 samples of ethanolic brown propolis, from the State of Mato Grosso, was investigated against Escherichia coli ATCC 25922. The values of physical and chemical parameters showed significant variation among samples. The percentage of dry extract ranged from 2.6 to 27.6%. The index of oxidation varied from 3 to 519 seconds. All samples showed the percentage of wax higher than the limit preconized by the legislation, with values varying from 3.4 to 74.6%. The quantification of phenolic and flavonoid compounds, responsible for antimicrobial activity, ranged from 0.1 to 5.0 (w/w) and 0.02 to 0.66 (w/w), respectively, being that the higher the index of phenolic compounds the larger the zones of inhibition. Antibacterial activity was observed in seven out of the 23 samples, demonstrating zones of inhibition ranging from 10 to 11.3mm. For these active samples, the minimum inhibitory concentration was determined, ranging from 125 to 1000mg/mL. The value of MIC in 42.9% of these samples was 250mg/mL. These results contribute to the establishment of physical and chemical parameters for the regulation of brown propolis and indicate possible therapeutic applicability in the development of formulations for the treatment of infections caused by E. coli.

Keywords: bee, brown propolis, antibacterial activity, physico-chemical indicators, Escherichia coli

AGRADECIMENTO

Ao Laboratório de Recursos Vegetais e Opoterápicos, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASIS, M. *Propoleo, el oro purpura de las abejas*. Havana, Cuba: Centro de Información y Documentación Agropecuario, 1989. 255p.
- BASTOS, E.M.A.F. *Origem botânica e indicadores de qualidade da própolis verde produzida em Minas Gerais*. 2001. 152f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.
- BASTOS, E.M.A.F.; SIMONE, M.; JORGE, DM. *et al.* *In vitro* study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Path.*, v.97, p.273-281, 2008.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001, Anexo VII: Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis. In: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>>. Acesso em 06.10.10.
- PADRONIZAÇÃO dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada – 8.ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003 (NCCL Document M2-A8).
- GHISALBERTI, EL. Propolis: a review. *Bee World*, v.60, p.59-84, 1979.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. *et al.* Phenolic compounds from Brazillian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharm.*, v.74, p.105-112, 2001.
- PARDO, M.L.A. Comparação entre a atividade antimicrobiana de própolis de abelhas indígenas sem ferrão e de própolis verde de *Apis mellifera*. 2007. 152f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- POPOVA, M.P.; CHINO, J.B.; MAREKOV, I.N. *et al.* Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*, v.70, p.1262-1271, 2009.
- SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.F.; RODRIGUES, P.H. *et al.* Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. *Anaerobe*, v.8, p.9-15, 2002.
- SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacol.*, v.99, p.69-73, 2005.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *et al.* *Microbiologia*. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.