

Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite*

Effect of green propolis extracts on patogenic bacteria isolated from milk of cows with mastitis

Marcelo Souza PINTO¹; José Eurico de FARIA²; Dejour MESSAGE³;
Sérvio Túlio Alves CASSINI⁴; Carmen Silva PEREIRA⁵; Marilú Martins GIOSO²

CORRESPONDÊNCIA PARA:
José Eurico de Faria
Departamento de Veterinária da
Universidade Federal de Viçosa
36571-000 – Viçosa – MG
e-mail: jefaria@mail.ufv.br

1- IESES – FACASTELO, Castelo – ES
2- Departamento de Veterinária da
Universidade Federal de Viçosa – MG
3- Departamento de Biologia Animal da
Universidade Federal de Viçosa – MG
4- CT - DHS - UFES, Vitória – ES
5- Departamento de Zootecnia da
Universidade Federal de Viçosa – MG

RESUMO

A sensibilidade, *in vitro*, de amostras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, *Streptococcus agalactiae* e bactérias do grupo dos coliformes, isoladas do leite de vacas com mastite, a diferentes extratos de própolis, na concentração de 100 mg/ml, foi avaliada pela técnica do antibiograma em discos de papel de filtro com sobrecamada de meio de cultura. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de própolis comercial, os extratos etanólico e, em menor proporção, o metanólico inibiram o crescimento das amostras de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*. Os extratos obtidos através da água, do acetato de etila e do clorofórmio não inibiram nenhuma amostra bacteriana, assim como os veículos etanol e metanol puros utilizados como controle. A bactéria Gram-negativa testada, do tipo coliforme, não apresentou sensibilidade a nenhum dos extratos. Verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) na sensibilidade aos extratos entre amostras bacterianas de uma mesma espécie, mas de origens diferentes. Nas amostras de *Streptococcus agalactiae*, os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco foram maiores que aqueles observados para as amostras de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. coagulase negativos. Todos estes resultados estimulam o prosseguimento de novas pesquisas sobre a utilização de extratos de própolis, em veículos adequados, com vistas ao tratamento da mastite bovina.

UNITERMOS: Própolis; Mastite; Agentes; Antibacterianos; Bovinos.

INTRODUÇÃO

A antibioticoterapia é o procedimento mais utilizado no tratamento da mastite bovina, porém a crescente preocupação com a presença de resíduos de antibióticos no leite e o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes têm estimulado a busca por meios alternativos que reduzam ou eliminem tais problemas.

Muitos trabalhos nacionais e estrangeiros ilustram a diversidade de atividades biológicas da própolis e, dentre elas, a antibacteriana. A maioria dos relatos mostra que os diversos tipos de extratos de própolis possuem acentuada ação inibidora, *in vitro*, sobre gêneros Gram-positivos e, em menor escala, sobre as bactérias Gram-negativas^{7,14,16,17,22,39,48}. As reconhecidas capacidades antiinflamatória e imunomodulatória da própolis^{20,32,33,46} também servem de estímulo para as investigações acerca de sua utilização em processos inflamatórios, como a mastite bovina.

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no Brasil e em todo o mundo e aquela que proporciona as maiores perdas econômicas na exploração de bovinos leiteiros¹³. Estima-se que, mundialmente, as perdas anuais causadas pela doença são por volta de 35 bilhões de dólares³⁴.

O princípio básico do controle da mastite é prevenir novas infecções. Apesar das medidas preventivas, algumas novas infec-

ções ainda ocorrem. Poucas vacas podem eliminar a infecção espontaneamente, enquanto, em outros casos, é requerido o descarte dos animais ou o uso de terapias com drogas⁴⁰. A antibioticoterapia para a mastite deve visar a eficácia terapêutica e benefícios econômicos, tanto do ponto de vista do aumento da produção como na redução das fontes de infecção (quartos infectados). A terapia tem por meta a eliminação das infecções preestabelecidas e, para tanto, é necessário que o antimicrobiano atinja concentrações no úbere maiores ou pelo menos iguais à concentração inibitória mínima (MIC) para os principais patógenos da mastite^{9,34}.

Ainda deve-se ressaltar que os resíduos de antibióticos no leite de consumo representam riscos à saúde pública e interferem na produção dos derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes.

A própolis se constitui numa série de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, de consistência viscosa, recolhida de brotos e cascas de árvores ou de outras partes do tecido vegetal, pelas abelhas, que a transportam até a colmeia, onde adicionam e modificam sua composição, através de secreções próprias como a cera e secreções salivares essenciais ou, ainda, seria resultante do processo de digestão do pólen pelas abelhas^{8,15}. Possui aroma característico (balsâmico e resinoso), dependendo da origem botânica, cor variável desde a amarelada, esverdeada clara ao pardo escuro. Pode ter um sabor de suave balsâmico a forte, amargo e picante

* Apoio Financeiro: FAPEMIG

e a sua consistência varia do maleável à ligeiramente rígida, quando em temperatura ambiente, e rígida em temperaturas abaixo de 20°C¹. É composta, em média, por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen^{6,15,17,19,37}.

Possui uma composição química complexa, contendo mais de 160 componentes e, dentre os compostos químicos identificados, podem ser citados os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), chalconas, ácido benzóico e derivados, benzaldeídos, álcoois, cetonas, fenólicos, heteroaromáticos, álcool cinâmico e derivados, ácido cafeico e derivados, ácidos diterpenos e triterpenos, minerais e outros^{3,6,24,39,44,47}.

Entre as substâncias isoladas, preponderam os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), como uns dos principais responsáveis pelas atividades antiviróticas, antiparasitárias, antibacterianas, antioxidantes e demais propriedades farmacológicas observadas na própolis^{2,6,17,23}. As vitaminas B₁, B₂, B₆, C, E e minerais como manganês, ferro, cálcio, alumínio também já foram identificados em amostras de própolis²⁴, assim como os açúcares arabinose, frutose, glicose, sacarose e maltose⁶. Diversos pesquisadores relatam que na própolis brasileira os ácidos fenólicos são mais abundantes que os flavonóides^{2,26,43,49}. Dependendo do tipo de solvente empregado na extração ou mesmo das condições utilizadas no processo, haverá maior ou menor eficiência de extração das substâncias fenólicas, nas quais concentra-se a maior parte da atividade farmacológica da própolis²⁵.

Sugere-se que o extrato etanólico de própolis tem efeito bactericida causado pela presença de ingredientes muito ativos, porém, lábeis. É sugerido que a combinação de extratos de própolis com antimicrobianos possa permitir a redução da dose clínica de determinados antibióticos e, assim, diminuir a incidência de efeitos colaterais e ao mesmo tempo potencializar a antibioticoterapia no tratamento de infecções em que a resistência bacteriana torna-se fator determinante³¹. Nenhum componente isolado possui atividade antibacteriana sobre o *Staphylococcus aureus*, ou outra bactéria, tão potente quanto todo o extrato^{4,22,29}.

Existem poucos trabalhos na literatura científica sobre o uso de extratos de própolis e/ou derivados no tratamento ou prevenção da mastite bovina ou de outras espécies domésticas. O primeiro relato na literatura sobre tratamento de mastite através da própolis remonta de 1980³⁰.

No caso de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina, testes *in vitro* com amostras de extratos de própolis, originários da Polônia, mostraram uma concentração inibitória mínima em torno de 80 µg/ml²⁷. Meresta et al.²⁸ testaram um tratamento de mastite bovina com extrato de própolis. A recuperação completa foi observada em 86,6% das vacas com mastite aguda, em 100% dos casos de infecção causados por *Candida albicans*, 85% por *Escherichia coli*, 91% por *Staphylococcus* sp. e 84,3% por *Streptococcus* sp. Os autores ainda concluíram que a própolis apresenta-se bastante efetiva na terapia da mastite causada por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas vacas de raça Holandesa pura ou mestiça de Holandesa com Zebu, de propriedades localizadas na Zona da Mata de Minas Gerais. Após diagnosticada a mastite clínica e

subclínica, as amostras de leite para isolamento e identificação do agente foram colhidas, imediatamente antes da ordenha, em frascos estéreis, com os devidos cuidados de higiene e antissepsia¹³.

As amostras de leite foram inoculadas em placas contendo ágar sangue base, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas a 37°C, por 24-48 horas³⁵. Colônias com características macroscópicas próprias de estafilococos, estreptococos e coliformes foram transferidas para tubos contendo caldo cérebro coração de bezerro (BHI) e incubadas a 37°C, por 24 horas³⁵. Para a identificação das espécies bacterianas, além das características morfológicas pelo método de Gram, também foram utilizados testes específicos para identificação presuntiva de cada espécie.

A classificação presuntiva do *Staphylococcus aureus* se baseou nas seguintes provas, às quais apresentou resultados positivos: Hemólise em ágar sangue; Prova da Catalase¹⁸, Prova da coagulase⁴²; Reação da desoxirribonuclease (DNase)²¹, em ágar DNase; Fermentação do manitol, em ágar sal-manitol; Crescimento anaeróbico em meio líquido de tioglicolato de Brewer¹² e Reação de Voges-Proskauer⁵.

Os estreptococos foram identificados de acordo com a Prova da Catalase¹⁸, Reação de CAMP⁴¹ e tipo de hemólise em ágar sangue de carneiro.

As colônias que apresentaram características microscópicas próprias de bastonetes Gram-negativos foram estriadas em placas com meio eosina-azul de metileno (EMB). Considerou-se na identificação presuntiva, como positiva para coliformes, após incubação a 37°C, por 24 horas, no meio EMB, a presença de colônias negras e a coloração verde-metálica do meio de cultura⁴¹.

Para o teste de sensibilidade à própolis foram avaliadas quatro amostras diferentes de *Staphylococcus aureus*, quatro amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, quatro amostras de *Streptococcus agalactiae* e três amostras de Coliformes, obtidas conforme descrito acima. Os testes foram realizados em triplicata.

A amostra de própolis estudada foi produzida pelo sistema CPI® (Coletor de Própolis Inteligente), desenvolvido pelo apicultor Sr. Adomar Jesus de Carvalho. Foi colhida em colmeias de abelhas africanizadas, *Apis mellifera*, numa propriedade rural localizada no Município de Itapeçerica (MG), e cedida pelo referido apicultor. A própolis possuía cor verde e odor balsâmico agradável.

A própolis utilizada foi submetida a um fracionamento seqüencial utilizando-se os seguintes solventes extratores, segundo uma ordem decrescente de polaridade: água, etanol, metanol, acetato de etila e clorofórmio, numa concentração de 10% (p/v). Para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos de própolis, utilizou-se uma técnica de antibiograma em discos de papel de filtro com sobrecamada de meio de cultura. Discos de papel filtro (Whatman número 1), com 7 mm (milímetros) de diâmetro, foram impregnados com alíquotas de 40 µl e 60 µl, ambos na concentração de 10%, de cada fração extraída da própolis (F-H₂O, F-EtOH, F-MeOH, F-EtAc e F-Chl). Estes discos foram fixados sobre o meio de ágar-ágar. Paralelamente, prepararam-se, em tubos, 10 ml do meio BHI semi-sólido, a 0,75%, adicionados com 1 ml da cultura bacteriana a ser testada previamente crescida por 18 horas a 37°C em BHI. O conteúdo destes tubos foi vertido sobre as placas para a obtenção de uma fina sobrecamada de meio. As placas, então, foram incubadas a 37°C

por 18 a 24 horas. A inibição foi indicada pela presença de halo em volta do disco, onde não havia crescimento bacteriano visível. Discos de papel impregnados com etanol e metanol puros foram utilizados para verificar se exerciam efeito inibidor capaz de alterar os resultados finais do teste, mesmo após transcorrido o tempo para a evaporação. Também foi utilizado, para efeito de comparação, um extrato etanólico de própolis, de origem desconhecida, adquirido no comércio local, nas mesmas alíquotas adotadas para os outros extratos.

Para a análise estatística dos dados foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla Tukey, considerando o experimento como do tipo Fatorial no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Todas as análises estatísticas foram realizadas no Software SAEG/UFV, versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato aquoso não exerceu nenhum efeito inibidor do crescimento de nenhuma amostra bacteriana testada (Tab. 1, 2 e 3), estando de acordo com os dados de Brumfitt et al.⁷ e Park e Ikegaki³⁸. Tal dado mostra mais uma vez que os componentes ativos com capacidade antibacteriana na própolis (fenólicos, flavonóides, ácidos e outros) não são solubilizados pela água, um solvente de alta polaridade, conforme também verificado por Woisky e Salatino⁴⁹, Marcucci et al.²⁵, Negri et al.³⁶ e Dantas et al.¹⁰. Park e Ikegaki³⁸ também observaram que o extrato aquoso de própolis não exibiu atividade antibacteriana sobre espécies Gram-positivas e que quando o solvente utilizado possuía uma porcentagem de água superior a 50%, menor era a atividade antibacteriana do respectivo extrato.

Os extratos acetato de etila e clorofórmio não apresentaram nenhum efeito inibitório (Tab. 1, 2 e 3), no entanto isto pode estar relacionado à maneira como foi realizado o processo de extração, ou seja, seqüencial. Assim, possivelmente possa ter ocorrido uma completa, ou quase completa, extração dos compostos biologicamente ativos pelos solventes que os antecederam, o etanol e metanol, nos quais a própolis possui ótima solubilidade.

Os resultados dos testes de inibição de crescimento de quatro amostras de *Staphylococcus aureus* pelos diferentes extratos da própolis estudada, extrato comercial e controle dos veículos etanol e metanol são apresentados na Tab. 1.

O extrato etanólico comercial produziu halos de inibição com diâmetros maiores que os encontrados no extrato etanólico teste (F-EtOH) ($p < 0,05$), em duas amostras, UFV e Viçosa I, embora não tenha esta diferença ($p > 0,05$) nos tamanhos dos halos nas amostras Viçosa II e Viçosa IV. A amostra UFV mostrou ser a mais sensível aos extratos etanólico comercial, etanólico e metanólico, seguida da amostra Viçosa I.

As amostras Viçosa II e Viçosa IV não diferiram entre si na sensibilidade aos três extratos e também foram as que apresentaram menor sensibilidade. Tais achados ilustram diferenças entre amostras bacterianas de uma mesma espécie, mas de origens diferentes.

O fato de o extrato metanólico (F-MeOH) ter apresentado menor capacidade em inibir as quatro amostras bacterianas, se comparado ao F-EtOH, pode ter duas possíveis explicações. O etanol, que foi aplicado à própolis antes do metanol, poderia ter

Tabela 1

Diâmetros médios, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento de quatro amostras de *Staphylococcus aureus*, determinados pelos extratos de própolis, na concentração de 10%.

Extrato	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Amostra UFV	Amostra Viçosa I	Amostra Viçosa II	Amostra Viçosa IV
Ext. Comercial	14,30 a ^A	11,33 a ^B	9,16 a ^C	9,83 a ^C
F-EtOH	11,16 b ^A	9,83 b ^B	8,66 a ^C	9,00 a ^C
F-MeOH	9,33 c ^A	8,16 c ^B	0,00 b ^C	0,00 b ^C
F-H ₂ O	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
F-EtAc	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
F-Chl	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
Controle EtOH	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
Controle MeOH	0,00 d ^A	0,00 d ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A

Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

extraído a maior parte dos compostos bioativos, restando somente uma pequena quantidade destes ou apenas traços, para que o metanol pudesse extrair. Ou que as substâncias que estavam presentes na F-MeOH realmente fossem solúveis apenas em metanol e, por conseguinte, não foram extraídas pelo etanol. Tal fato demonstra a necessidade de aumentar as pesquisas na área de métodos de extração da própolis.

Os diâmetros médios dos halos de inibição do crescimento do *S. aureus* ao extrato etanólico variou entre 8,66 e 11,16 mm. Essas dimensões não foram muito diferentes das encontradas por outros autores. Brumfitt et al.⁷, em experimento semelhante, encontraram halos de inibição de *S. aureus* com diâmetros que variaram entre 7 e 14 mm (média = 13 mm), em discos de papel de filtro (diâmetro = 6 mm) impregnados com extrato etanólico de própolis na mesma concentração utilizada neste trabalho, 10%. Esta mesma concentração foi utilizada por Bankova et al.², que, trabalhando com quatro amostras de própolis brasileira, mas utilizando extrato produzido por etanol a 70%, encontraram halos de inibição cujos diâmetros variaram entre 6 e 10 mm. Kujumgiev et al.²², estudando estas mesmas quatro amostras brasileiras, também na concentração de 1 g/10 ml, observaram halos variando entre 10 e 13 mm de diâmetro. Dobrowolski et al.¹¹ encontraram diâmetro médio de 16 mm usando uma concentração de 300 mg/ml de extrato etanólico de própolis da Polônia. Bankova et al.⁴, estudando extrato metanólico (1 g/10 ml) de uma amostra de própolis brasileira, encontraram halos de inibição que tiveram o diâmetro médio de $11,8 \pm 0,8$ mm. Deve-se ressaltar ainda que fatores como a metodologia adotada no processo de extração da própolis e o método adotado para a avaliação da inibição do crescimento bacteriano podem alterar completamente o resultado de um experimento em relação ao encontrado por outro pesquisador.

Os resultados dos testes de inibição de crescimento de quatro amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativos pelos diferentes extratos da própolis estudada, extrato comercial e controle dos veículos etanol e metanol são apresentados na Tab. 2.

Diferentemente do observado entre algumas das amostras de *Staphylococcus aureus*, o extrato comercial produziu halos de inibição com diâmetros que não diferiram ($p > 0,05$) dos encontrados na F-EtOH, em todas as quatro amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativas estudadas, mesmo estas sendo de origens diferentes.

As quatro amostras apresentaram perfis de sensibilidade à F-EtOH semelhantes, com diâmetros médios dos halos de inibição variando entre 8,33 mm (Amostra Fundação II) e 10,00 mm (Amostra UFV). Esta semelhança de sensibilidade das amostras também pôde ser comprovada através do extrato etanólico comercial, em que as quatro médias dos halos de inibição não diferiram entre si ($p > 0,05$).

Quanto à F-MeOH, esta mostrou-se ineficiente em inibir as amostras bacterianas em relação aos extratos etanólicos, diferente do que foi observado para o *Staphylococcus aureus*. Todas as amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativas estudadas não mostraram sensibilidade a F-MeOH.

Os resultados dos testes de inibição de crescimento de quatro amostras de *Streptococcus agalactiae* pelos diferentes extratos da própolis estudada, extrato comercial e controle dos veículos etanol e metanol são apresentados na Tab. 3.

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano entre extrato etanólico comercial e F-EtOH, dentro de cada amostra de *Streptococcus agalactiae*, assim como foi observado para as amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativas.

As amostras *S. agalactiae* Porto Firme I e Porto Firme III, cujas sensibilidades ao extrato comercial e à F-EtOH foram iguais entre si ($p > 0,05$), foram as que apresentaram maiores sensibilidades a estes dois extratos, ao passo que as amostras UFV II e Porto Firme II, também de sensibilidades iguais entre si ($p > 0,05$), demonstraram menores susceptibilidades aos respectivos extratos.

Tabela 2

Diâmetros médios, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento de quatro amostras de *Staphylococcus* sp. coagulase negativa, determinados pelos extratos de própolis, na concentração de 10%.

Extrato	<i>Staphylococcus</i> sp Coagulase Negativos			
	Amostra Fundação I	Amostra Fundação II	Amostra UFV	Amostra Porto Firme
Ext. Comercial	9,33 a ^A	9,33 a ^A	9,66 a ^A	10,16 a ^A
F-EtOH	9,16 a ^{AB}	8,33 a ^B	10,00 a ^A	8,83 a ^{AB}
F-MeOH	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^B	0,00 b ^B
F-H ₂ O	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
F-EtAc	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
F-Chl	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
Controle EtOH	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A
Controle MeOH	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A	0,00 b ^A

Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 3

Diâmetros médios, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento de quatro amostras de *Streptococcus agalactiae*, determinados pelos extratos de própolis, na concentração de 10%.

Extrato	<i>Streptococcus agalactiae</i>			
	Amostra UFV II	Amostra Porto Firme I	Amostra Porto Firme II	Amostra Porto Firme III
Ext. Comercial	13,33 a ^B	15,50 a ^A	13,33 a ^B	14,66 a ^A
F-EtOH	12,16 a ^B	14,33 a ^A	12,50 a ^B	13,83 a ^A
F-MeOH	8,16 b ^B	0,00 b ^C	11,00 b ^A	8,00 b ^B
F-H ₂ O	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
F-EtAc	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
F-Chl	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
Controle EtOH	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A
Controle MeOH	0,00 c ^A	0,00 b ^A	0,00 c ^A	0,00 c ^A

Para a variável analisada, letras maiúsculas codificam a análise estatística em cada linha e letras minúsculas codificam a análise estatística em cada coluna. Os valores seguidos de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Os diâmetros médios dos halos de inibição, em todos os três extratos que mostraram atividade antibacteriana, foram claramente maiores que os encontrados nas duas outras espécies bacterianas estudadas. Para o extrato etanólico comercial, variou de 13,33 a 15,5 mm e nas F-EtOH e F-MeOH, de 12,16 a 14,33 mm e 8,16 a 11,0 mm de diâmetro (com exceção da amostra P. Firme I, que foi zero), respectivamente. Esses resultados demonstram que o *Streptococcus agalactiae* é aparentemente mais sensível à própolis do que as outras espécies aqui estudadas. É sabido que o *S. agalactiae* se apresenta muito mais sensível aos agentes antimicrobianos de uso comum (antibióticos e quimioterápicos) se comparado ao *S. aureus* e outros agentes bacterianos causadores de mastite bovina.

A espécie Gram-negativa avaliada não apresentou sensibilidade a nenhum dos extratos, não evidenciando halo de inibição. Este comportamento, de certa forma, poderia ser esperado, uma vez que muitos relatos ilustram que a própolis detém maior poder antibacteriano sobre as espécies Gram-positivas, sendo pouco eficaz ou incapaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas^{7,14,16,17,22,39,48}. Esta diferença de sensibilidade entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pode ser devido às grandes diferenças na constituição química da parede celular destes dois grupos de bactérias. Enquanto na parede celular dos gêneros Gram-negativos a quantidade de peptidoglicanos se encontra numa fração menor quando comparado ao que ocorre nas bactérias Gram-positivas, o conteúdo lipídico e a complexidade química da parede celular das bactérias Gram-negativas são consideravelmente maiores que nas Gram-positivas. Segundo Takaisi-Kikuni e Schilcher⁴⁵, o extrato etanólico de própolis inibe o crescimento bacteriano por prevenir a divisão celular e por produzir defeitos na estrutura da parede celular, levando à bacteriólise parcial e à formação de bactérias pseudomulticelulares (policarióticos) e, ainda, desorganiza o citoplasma, caracterizado pela presença de espaços vazios ou estruturas fibrosas (“fibrous-like”), além de causar alteração na membrana citoplasmática e inibir a síntese protéica.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados e nas condições em que foi conduzido o presente experimento, pode-se concluir que: a amostra de própolis estudada exerceu efeito antibacteriano através dos extratos etanólico e, em menor proporção, do metanólico, sobre o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase

negativos, e *Streptococcus agalactiae*, mas não mostrou capacidade em inibir o crescimento das amostras Gram-negativas, nas concentrações utilizadas. Os extratos aquoso, acetato de etila e clorofórmio não apresentaram efeito antibacteriano sobre as amostras bacterianas estudadas. Amostras diferentes, de uma mesma espécie bacteriana, diferiram quanto à sensibilidade à própolis.

SUMMARY

In vitro, the sensitivity to different propolis extracts, at a concentration of 100 mg/ml, of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negative, *Streptococcus agalactiae* and bacteria of the coliform group, isolated from the milk of cows with mastitis, was evaluated using the technique of an agar disk diffusion with a medium doublelayer. The results showed that the commercial propolis, the ethanolic extract, and, in a minor proportion, the methanolic extract inhibited the growth of the Gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negative and *Streptococcus agalactiae*. The extracts obtained through water, etila acetate and chloroform did not inhibit any bacterial strains, nor did the pure ethanol and methanol vehicles that were utilized as controls. The Gram negative bacterium tested, from the coliform group, did not show sensitivity to any extract. Bacterial strains of the same species collected from different sources presented significant differences in sensitivity to the extracts ($p < 0.05$). In the *Streptococcus agalactiae* samples, the diameters of the zone of inhibition around the disks were bigger than those observed for samples of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* sp. coagulase negative. The results of this experiment stimulate the continuation of studies on the use of propolis extracts, by means of using the appropriate vehicles for the treatment of bovine mastitis.

UNITERMS: Propolis; Mastitis; Antibacterial; Agents; Cattle.

REFERÊNCIAS

- 1- APACAME - Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias. Regulamentos Técnicos para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis, **Mensagem Doce**, n. 52, p. 13-14, 1999.
- 2- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 50, n. 3/4, p. 167-172, 1995.
- 3- BANKOVA, V.; KRASTEVA, G. B.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361-367, 1998.
- 4- BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 51, n. 5/6, p. 277-280, 1996.
- 5- BIER, O. Técnicas bacteriológicas. In: BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. Cap. 50, p. 919-998.
- 6- BONVEHI, J. S.; COLL, F. V.; JORDÁ, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 71, n. 5, p. 529-532, 1994.
- 7- BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. **Microbios**, n. 62, p. 19-22, 1990.
- 8- CIZMARIK, J.; MACICKA, M.; MATEL, I. Analisis y critica de las teorías acerca de la formación del Propoleos. In: **Propoleos - Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**, Apimondia: Bucarest, 1975. 175 p.
- 9- COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 422-434.
- 10- DANTAS, T. N. C.; NETO, A. A. D.; SILVA, H. S. R. C. Desenvolvimento de sistemas microemulsionados utilizando a própolis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 200, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos**. Poços de Caldas, 2000. v. 2, PN-055.
- 11- DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORA, S. B.; SHARMA, K.; SHAH, S. A.; NAQVI, S. A. H.; DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 77-82, 1991.
- 12- EVANS, J. B.; KLOOS, W. E. Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. **Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 326-331, 1972.
- 13- FARIA, J. E. **Prevenção e controle de infecção estafilocócica da glândula mamária pela vacinação e/ou antibioticoterapia associada ao dimetilsulfóxido (DMSO)**. 1995. 101 f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 14- FUENTES, A. M. O.; HERNANDEZ, N. R. Accion antimicrobiana de los extractos alcoholicos de propoleo. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 24, n. 1, p. 34-44, 1990.
- 15- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.
- 16- GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade "in vitro" do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. 1995. 18f. Monografia - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- 17- GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.
- 18- HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavia**, p. 1-144, 1973. Supplement, 45.
- 19- IOIRISH, N. Propoleos. In: **Propoleos - Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**, Bucarest: Apimondia, 1975. 175 f.
- 20- IVANOVSKA, N. D.; DIMOV, V. B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 135-143, 1995.
- 21- KOWALSKI, J. J. Microbial agents and bovine mastitis. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 10, p. 1175-1177, 1977.
- 22- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.
- 23- LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; FUNARI, S. R. C.; CHANDE, C. G.; NEVES, I. R.; LISTONI, F. J. P. Efeito antimicrobiano *in vitro* da própolis. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994, Rio Cuarto. **Anais...** Rio Cuarto, Argentina, 1994. p. 189-192.

- 24- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.
- 25- MARCUCCI, M. C.; NEGRI, G.; CUNHA, I. B. S. Substâncias fenólicas em diferentes extratos de própolis, avaliadas por CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22., 1999, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas, 1999a. v. 3, TC-031.
- 26- MARCUCCI, M. C.; NEGRI, G.; OLIVEIRA Jr., M. Isolamento e identificação de uma substância fenólica em própolis brasileira, por CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22., 1999, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos.** Poços de Caldas, 1999b. v. 2, PN-139.
- 27- MERESTA, L.; MERESTA, T. Sensitivity of bovine mastitis bacteria to propolis in vitro. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 41, n. 8, p. 489-492, 1985.
- 28- MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using an extract of propolis. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 45, n. 7, p. 392-395, 1989.
- 29- METZNER, J.; BEKEMEIER, M.; PAINTZ, M.; SCHNEIDEWIND, E. On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. **Pharmazie**, v. 34, n. 2, p. 97-102, 1979.
- 30- MIROLYUBOV, M. G.; BARSKOV, A. A. Propolis for bovine mastitis. **Veterinariya**, n. 2, p. 45-46, 1980.
- 31- MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.
- 32- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; ISOBE, A.; SATOH, T. Evaluation of propolis. II. Effects of Brazilian and Chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and concanavalin A. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 7, p. 723-729, 1998.
- 33- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n. 5, p. 496-501, 1997.
- 34- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed. Madison: The National Mastitis Council Press, 1998. 64 p.
- 35- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis**. Washington D. C.: University of New Hampshire Press, 1969. 27 p.
- 36- NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; OLIVEIRA Jr, M. Estudo de ceras de própolis brasileiras através da utilização da CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22., 1999, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos.** Poços de Caldas, 1999a. v. 3, QA-123.
- 37- NIKOLAEV, A. B. Defensa de la ciudad de las abejas. In: **Propoleos - Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**. Bucarest: Apimondia, 1975. 175 p.
- 38- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998.
- 39- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, n. 1, p. 97-106, 1997.
- 40- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter attack**. Naperville, Illinois: Babson Bros, 1997. 150 p.
- 41- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. **Clinical veterinary microbiology**. 1.ed. Spain: Wolfe, 1994. 648 p.
- 42- SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea e Febirger, 1971. 360 p.
- 43- SEIXAS, F. R. M. S.; PEREIRA, A. S.; RAMOS, M. F. S.; NETO, F. R. A. Composição química da própolis brasileira das regiões sul e sudeste. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas, 2000. v. 2, PN-050.
- 44- SOARES, J. D. M.; CITÓ, A. M. G.; LOPES, J. A. D.; CHAVES, M. H. Triterpenos isolados de própolis piauiense. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas, 2000. v. 2, PN-054.
- 45- TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medica**, v. 60, n. 3, p. 222-227, 1994.
- 46- TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 7, p. 966-970, 1996.
- 47- WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of Propolis. **Apidologie**, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.
- 48- WOISKY, R. G.; GIESBRETCH, A. M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 30, n. 1, p. 19-21, 1994.
- 49- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

Recebido para publicação: 12/09/2000
Aprovado para publicação: 31/01/2002