

Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil

Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil

Ary Fernandes Júnior¹ Marcelo Milanda Ribeiro Lopes² Viviani Colombari²
Aydin Cecília Marinho Monteiro² Eliane Passarelli Vieira²

- NOTA -

RESUMO

As propriedades biológicas da própolis de *Apis mellifera* são amplamente relatadas sendo comuns variações nas mesmas em função da região onde foram produzidas. A ação antimicrobiana de própolis obtidas em três regiões do Brasil (Botucatu-SP, Mossoró-RN e Urubici-SC) foi investigada sobre linhagens isoladas de infecções clínicas humanas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*). Foram preparados extratos alcoólicos de própolis (EAP) e determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguida do cálculo da CIM90%. A própolis de Botucatu foi a mais eficiente sobre *S. aureus* (0,3%v/v), *Enterococcus sp* (1,1%v/v) e *C. albicans* (2,1% v/v). Para *E. coli*, a própolis eficiente foi de Urubici (7,0%v/v) e para *P. aeruginosa* a de Mossoró (5,3%v/v). Os resultados mostram maior sensibilidade das bactérias Gram positivas e levedura em relação às Gram negativas. É possível concluir que, para os microrganismos testados e amostras de própolis testadas, há diferenças na atividade antimicrobiana em função do local de produção e que isso se explica pela diferença de composição química da própolis.

Palavras-chave: *Abelha mellifera*, extratos alcoólicos, bactérias, *Candida albicans*.

ABSTRACT

The antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis is widely reported, and the variations in this property according to the region where it was produced have been mentioned. Thus, the antimicrobial activity of propolis from three Brazilian regions (Botucatu, SP; Mossoró, RN and Urubici, SC) was investigated on isolated strains from human clinical material

(*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*). Ethanollic Extracts of Propolis (EEP) were prepared and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined based on the method of EEP dilution in agar and the MIC90% calculated. Propolis from Botucatu was the most effective against *S. aureus* (0.3%v/v), *Enterococcus sp* (1.1%v/v), and *C. albicans* (2.1% v/v). The effective propolis against *E. coli* was from Urubici (7.0%v/v), and against *P. aeruginosa*, from Mossoró (5.3%v/v). The results shows that there are differences in the activity according to the region where the propolis were produced and Gram positive bacteria were more susceptible than Gram negative bacteria.

Key words: Honeybee, ethanollic extracts, bacteria, *Candida albicans*.

A própolis é produzida pelas abelhas para as mais variadas funções na colméia (preenchimento de frestas, diminuição de aberturas de entrada e saída da colméia, mumificação de cadáveres de insetos, para impedimento de sua decomposição e putrefação). É utilizada também para cobrir as paredes internas da colméia e interior das células para defendê-las dos microrganismos, além de reparar os favos estragados e consolidar os favos móveis (GHISALBERTI, 1979). É conhecida por suas propriedades biológicas tais como: antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências (IB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, SP, Brasil, Distrito de Rubião Junior, 18.618-000. Email: ary@ibb.unesp.br.

²IB, UNESP, Campus de Botucatu, SP, Brasil, Distrito de Rubião Junior, 18.618-000.

anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (PARK et al., 2002). A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua ação sobre *Staphylococcus aureus* (FERNANDES JUNIOR et al., 1995, 1997, 2001 e 2003; PINTO et al., 2001); *Streptococcus pyogenes* (BOSIO et al., 2000); *Candida* sp (SFORCIN et al., 2000; STEPANOVIC et al., 2003) e sobre inúmeros outros microrganismos (BANSKOTA et al., 2001). Foi verificado também que bactérias Gram positivas se mostram mais sensíveis que as Gram negativas aos extratos de própolis (PINTO et al., 2001).

Os flavonóides, juntamente com ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. Outros compostos são óleos voláteis e ácidos aromáticos (5 a 10%), ceras (30-40%), resinas, bálsamo e pólen que é uma rica fonte de elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco (CASTALDO & CAPASSO, 2002, PIETTA et al., 2002). O mecanismo de atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonóides, hidroxíácidos e sesquiterpenos (KROL et al., 1993). A proporção destas substâncias presentes na própolis é variável em função do local e da época de coleta da mesma (STEPANOVIC et al., 2003). Portanto, a origem geográfica da própolis é importante no controle de qualidade inclusive para sua efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002).

O estudo teve por objetivo verificar “in vitro” a atividade antimicrobiana de extratos alcoólicos de própolis (EAP) de *Apis mellifera* obtidas nas localidades de Botucatu –SP (latitude 22°53’09” Sul e Longitude 48°26’42” Oeste, altitude 804 metros); Urubici – SC (latitude 28° 00’48” Sul e Longitude 49°35’22” Oeste, altitude de 915m) e Mossoró - RN (latitude 05° 11’ 15” Sul e Longitude 37°20’39” Oeste, altitude 16 metros) e preparados extratos alcoólicos (EAP) (30 gramas de própolis em 100 mL de álcool etílico 70% e após sete dias filtração em papel de filtro) (FERNANDES JUNIOR et al., 2003).

As linhagens microbianas, e respectivos números testados, isoladas de materiais clínicos humanos, foram *Staphylococcus aureus* (61), *Enterococcus* sp (32), *Escherichia coli* (65), *Pseudomonas aeruginosa* (30) e *Candida albicans* (32). Os ensaios de sensibilidade foram realizados em duplicatas em placas de Petri com concentrações de EAPs em %v/v (% vol.EAP/vol. meio), segundo a técnica da diluição em ágar (Meio de Muller-Hinton Ágar para *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*; BHI Ágar para *Enterococcus* sp e Sabouraud Dextrose Ágar para *C. albicans*) (NCCLS, 2000) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Foram

preparadas placas para controle do etanol e do crescimento normal das linhagens. As linhagens foram cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (37°C/24 horas) e, após padronização (10⁵ a 10⁶ UFC/mL), semeadas utilizando carimbo multiinoculador de Sterr e seguida de incubação (37°C/24 horas) foi feita leitura da CIM. A análise estatística foi feita de acordo com teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para confrontar tratamentos independentes e para análises com diferenças significativas (P<0,001), realizou-se um teste de comparações múltiplas entre os tratamentos (teste de Student-Newman-Keuls e teste de Dunn) (Minitab Statistical Software version 13.32).

Os valores de CIM 90% e amplitude a das concentrações (% v/v) capazes de inibir as linhagens testadas são apresentadas na tabela 1. De acordo com os menores valores de CIM que representam maior eficiência inibitória dos EAPs (P=<0,05) verifica-se que para *S. aureus*: Botucatu > Mossoró = Urubici > Álcool; *Enterococcus* sp: Botucatu > Mossoró > Urubici > Álcool; *E. coli*: Urubici > Botucatu > Mossoró > Álcool; *P. aeruginosa*: Mossoró > Botucatu = Urubici = Álcool e *C. albicans*: Botucatu > Mossoró > Urubici > Álcool.

A atividade antimicrobiana variou de acordo com o local em que a amostra de própolis foi produzida, sendo as bactérias Gram positivas (*S. aureus* e *Enterococcus* sp) e *C. albicans* mais susceptíveis à própolis obtida na região de Botucatu enquanto para as Gram negativas, a amostra de Urubici foi a mais eficiente sobre *E. coli* e a de Mossoró para *P. aeruginosa*. Embora não tenha sido feita a análise físico-química, e considerando que todos os ensaios biológicos foram realizados sob as mesmas condições experimentais, a explicação dos resultados pode ser atribuída à composição química distinta entre os EAP das três localidades testadas. Alguns autores sugerem que a comparação dos resultados é difícil em função das diferentes metodologias de avaliação da propriedade antimicrobiana utilizadas (DRAGO et al., 2000). Vários fatores interferem na composição química da própolis (clima, espécie de abelha e flora local) e refletem, de maneira decisiva, nas propriedades biológicas do produto (PARK et al., 2002).

As bactérias Gram positivas foram mais sensíveis ao EAP, independente do local de coleta. Este fato tem sido relatado com frequência na literatura (FERNANDES JUNIOR et al., 1995, 1997; STEPANOVIC et al., 2003; VARGAS et al., 2004). A maior sensibilidade das Gram positivas aos componentes da própolis fica evidente quando é comparada à ação do etanol, cujo CIM90% variou de 10,2 a 12,4% v/v, enquanto para os EAPs foi de 0,3% até 3,8% v/v. Neste caso, as diferenças

Tabela 1 - Valores de CIM 90% (%v/v) e amplitude da CIM para as linhagens microbianas testadas em função das amostras de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil.

Microrganismo	Botucatu (SP)% v/v	Mossoró (RN) % v/v	Urubici (SC) %v/v	Controle do alcool %v/v
<i>S. aureus</i> (61)				
CIM 90%	0,3 (a) 0,2 - 0,4	1,5 (b) 0,4 - 2,0	1,8 (b) 0,4 - 2,0	12,4 (c)
Amplitude				
<i>Enterococcus</i> sp (32)				
CIM 90%	1,1 (a) 0,8 - 1,2	3,5(b) 0,8 - 4,0	3,8 (c) 2,5 - 4,0	10,2 (d)
Amplitude				
<i>E. coli</i> (65)				
CIM 90%	8,5 (b) 6,0 - 9,0	8,2 (c) 5,5 - 8,5	7,0 (a) 5,5 - 7,5	9,8 (d)
Amplitude				
<i>P. aeruginosa</i> (30)				
CIM 90%	5,9 (b) 5,0 - 6,0	5,3 (a) 5,0 - 6,5	6,0 (b) 6,0 - 6,0	6,0 (b)
Amplitude				
<i>C. albicans</i> (32)				
CIM 90%	2,1 (a) 1,0 - 3,0	3,1 (b) 3,0 - 3,5	4,4 (c) 3,0 - 5,5	7,0 (d)
Amplitude				

Letras diferentes, nas linhas, indicam diferenças estatísticas entre si (P<0,05).

CIM = Concentração Inibitória Mínima

estruturais entre bactérias Gram positivas e negativas interferiram com a ação dos EAPs e a utilização da própolis de *A. mellifera* no tratamento de doenças causadas por bactérias Gram negativas deve ser avaliada com reserva.

Estudos desta natureza devem ser estimulados, pois fornecem informações importantes para obter um perfil geográfico sobre as regiões produtoras e as propriedades biológicas que possuem. Portanto, novos estudos deverão ser realizados, utilizando-se de um número maior de amostras de própolis de cada região pesquisada a fim de obter resultados mais representativos de cada região, podendo também acrescentar nestes estudos futuros aspectos da sazonalidade na produção da própolis, conforme sugestões em estudos recentes realizados por SFORCIN et al. (2000).

REFERÊNCIAS

- BANSKOTA, A.H. et al. Review article – Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother Res**, v.15, n.7, p.561-571, 2001.
- BOSIO, K. et al. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Lett Appl Microbiol**, v.31, n.3, p.174-177, 2000.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, suppl.1, p.S1 – S6, 2002.
- DRAGO, L. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. **J Chemother**, v.12, n.5, p.390-395, 2000.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **J Venom Anim Toxins**, v.1, n.2, p.63-69, 1995.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J Venom Anim Toxins**, v.3, n.2, p.287-294, 1997.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **J Venom Anim Toxins**, v.7, n.2, p.173-182, 2001.
- FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellifera* preparados com diferentes concentrações de etanol como extrator. **Rev Ciênc Farm**, v.24, n.2, p.147-152, 2003.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, n.2, p.59-84, 1979.
- KROL, W., et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneim-Forsch Drug Res**, v.43, n.5, p.607-609, 1993.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard**. 5.ed. Wayne, PA: NCCLS, 2000. M100-S10 (M7).

- PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciênc Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.
- PIETTA, P.G. et al. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v.73, suppl.1, p.S7-S20, 2002.
- PINTO, M.S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.
- SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, v.73, n.1-2, p. 43-249, 2000.
- STEPANOVIC, S. et al. In vitro antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res**, v.158, n.4, p.353-357, 2003.
- VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.159-163, 2004.