

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE BIOFILMES FORMADOS POR *Staphylococcus aureus*

TONY PICOLI¹; CRISTINA MENDES PETER¹; IVE FRANCESA TROCCOLI
HEPPER²; GIULIA SOARES LATOSINSKI²; JOÃO LUÍZ ZANI³; GEFERSON
FISCHER³

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária UFPel – picolivet@gmail.com;
cristina_peter@hotmail.com

²Graduanda em Veterinária UFPel – ivehepper@yahoo.com.br; giuliasl@hotmail.com

³Professor Adjunto do Departamento de Veterinária Preventiva UFPel – jluzzani@ig.com.br;
geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa ou algumas vezes cerosa, coletada por abelhas melíferas de diferentes exsudatos vegetais (KUJUMGIEV et al., 1999). Apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (MONTI et al., 1983; CIRASINO et al., 1987). A composição varia de acordo com o local de coleta e das espécies de abelha e vegetais envolvidos em sua produção (BANKOVA et al., 1995). Pelo menos 300 componentes diferentes já foram identificados em diferentes amostras de própolis, que estão envolvidos com as diversas propriedades terapêuticas e farmacológicas atribuídos a este produto das abelhas (MARCUCCI et al., 2001).

Extratos etanólicos, hidro-alcóolicos e aquosos da própolis têm sido utilizados e estudados em diferentes situações, demonstrando propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, dentre outras (BANKOVA, 2005; SIMÕES et al., 2008). Há algum tempo autores vêm escrevendo sobre o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos, que têm levado à seleção de micro-organismos patogênicos resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa, como relatou CRISAN et al. (1995), tema tão abordado nos dias atuais.

Alguns micro-organismos são capazes de formar biofilme, que pode ser definido como colônias bacterianas aderidas por meio de filamentos protéicos a uma superfície e envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos (COSTERTON et al., 1999). Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta, debaixo das quais os micro-organismos continuam a se multiplicar. Dessa forma, os micro-organismos se tornam mais resistentes à ação de agentes físicos e químicos (MARQUES, 2005).

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido, catalase-positivos e capazes de se multiplicar em meio contendo grande concentração de cloreto de sódio (KLOOS & BANNERMAN, 1999). Em especial *Staphylococcus aureus*, produz uma ampla variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonizar e de causar doenças em diversos hospedeiros e a sua capacidade de formar biofilme é mediada pela produção de um polissacarídeo intercelular aderente codificado pelo gene conhecido como *ica* (STANLEY & LAZAZZERA, 2004). Dessa forma, objetivou-se verificar o efeito do extrato etanólico de própolis verde sobre biofilmes formados por diferentes cepas de *S. aureus*.

2. METODOLOGIA

Foram testadas 70 cepas de *S. aureus* isoladas a partir de amostras de leite provenientes de tanques refrigeradores de propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul. As cepas foram previamente isoladas e caracterizadas e fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Os isolados bacterianos, estocados em caldo enriquecedor BHI (Brain-Heart Infusion) acrescido de glicerina em temperatura inferior a -10°C , foram descongelados e semeados em meio de cultura Agar-sangue com 5% de sangue ovino desfibrinado, e as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas. As colônias obtidas foram suspensas em 2mL de solução salina estéril a 0,85% até a turbidez ser ajustada perante a escala 4 de McFarland. Após esse procedimento, 10 μL das suspensões bacterianas foram dispensados em placas de 96 cavidades com 100 μL de caldo BHI em cada cavidade. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 horas para formação de biofilme bacteriano.

O extrato etanólico de própolis verde foi obtido através da trituração da própolis bruta e imerso em álcool etílico absoluto, onde permaneceu em constante agitação sob temperatura de 37°C durante 24 horas. A solução foi então filtrada e rotaevaporada para se obter o extrato. A concentração foi obtida através da secagem de 2 gramas do extrato em estufa a 100°C durante duas horas. A esterilização do composto foi realizada em filtro hidrofílico com porosidade de 22 μm . O produto obtido foi diluído em solução salina 0,85% até as concentrações 100, 50, 25 e 12,5 mg/mL, que foram dispensadas em volume de 100 μL nas cavidades das microplacas após 3 lavagens com solução tampão PBS estéril. As placas novamente foram incubadas a 37°C durante 18 horas, quando o sobrenadante foi retirado, e realizadas mais 3 lavagens idênticas as anteriores.

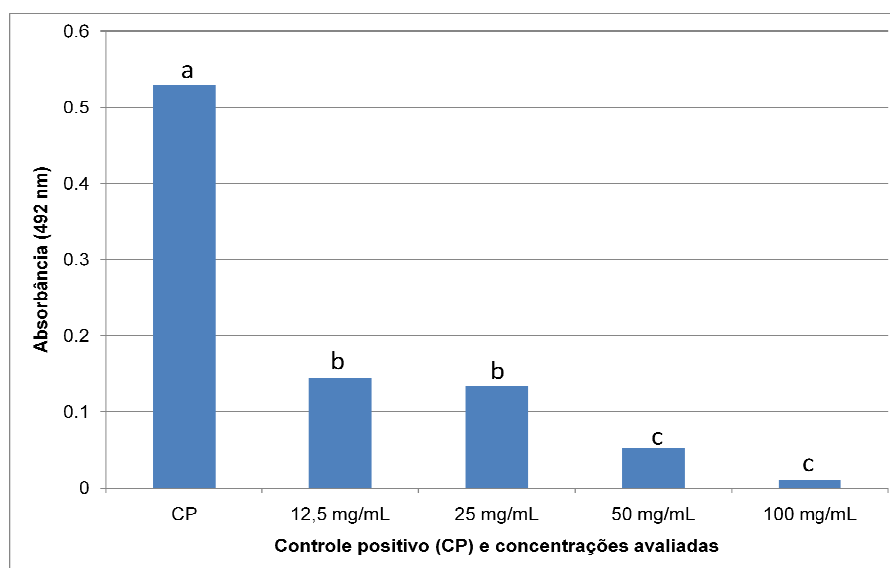
Para avaliação da quantidade de biofilme destruído foi utilizado MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que quantifica viabilidade celular através de enzimas desidrogenases mitocondriais, gerando intensidade de coloração diretamente proporcional ao número de células bacterianas viáveis. Para tanto, a solução de MTT, preparada na concentração de 0,5 mg/mL foi acrescentada as cavidades (50 μL /poço) e as placas incubadas sob ambiente de microaerofilia durante 4 horas a 37°C , quando o sobrenadante foi retirado e 100 μL de Dimetilsulfóxido foi adicionado a todos os poços (para solubilização dos sais de formazan). As placas foram agitadas por 5 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro (492 nm). Quanto maior a absorbância, maior o número de células viáveis após a exposição ao extrato de própolis.

Todos os testes foram realizados em duplicata e os controles positivos foram testados em quadruplicata. Foi utilizado caldo BHI estéril como controle negativo e cultivo bacteriano sem adição de própolis como controles positivos. Foram consideradas cepas produtoras de biofilme aquelas cujas absorbâncias foram maiores que a média das absorbâncias dos controles negativos acrescidos de 2 desvios padrões. Para avaliação estatística foi realizada análise de variância com comparação entre médias pelo teste de Tukey, utilizando o software estatístico BioEstat versão 5.3.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao total, foram realizadas 873 avaliações, incluindo controles positivos, negativos e nas diferentes concentrações de própolis. A média de absorvância dos controles positivos foi de $0,529 \pm 0,335$ e diferiu estatisticamente dos demais grupos tratamento ($p < 0,01$), que apresentaram os seguintes resultados de absorvância: 100 mg/mL ($0,01 \pm 0,046$), 50 mg/mL ($0,05 \pm 0,08$), 25 mg/mL ($0,136 \pm 0,102$) e 12,5 mg/mL ($0,145 \pm 0,128$). A Figura 1 ilustra as médias de absorvâncias, demonstrando a queda na quantidade de células bacterianas viáveis presentes nos biofilmes, conforme a concentração do própolis verde.

Figura 1. Médias de absorvância de 70 cepas de *S. aureus* cultivadas em caldo de cérebro e coração, expostas ao extrato de própolis verde em diferentes concentrações.



Letras diferentes apontam para diferença estatística

Os resultados obtidos demonstram que, embora a média de absorvância aumente conforme diminui a concentração da própolis, a menor concentração utilizada neste experimento ainda foi capaz de dissolver o biofilme formado e inviabilizar as células bacterianas.

As relações entre as absorvâncias dos grupos tratamentos e do grupo controle foram as seguintes: 100 mg/mL (0,02), 50 mg/mL (0,1), 25 mg/mL (0,25) e 12,5 mg/mL (0,27). Esses dados sugerem a porcentagem de biofilme destruído frente às diferentes concentrações de própolis verde, ou seja, quanto maior a concentração maior a quantidade de biofilme destruído.

A utilização de compostos naturais na remoção de biofilmes deve ser considerada como alternativa aos sanitizantes químicos, que podem deixar resíduos em alimentos e/ou causar reações adversas em humanos e animais, já que os resultados aqui apresentados comprovam a eficácia do extrato etanólico de própolis verde na destruição de biofilmes formados por *S. aureus*.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que extratos etanólicos de própolis verde são eficazes na destruição de biofilmes produzidos por *S. aureus*, e

deve ser considerado como alternativa para este fim. No entanto, estudos futuros devem ser desenvolvidos com objetivo de avaliar citotoxicidade dos extratos e o tempo ideal de contato com os biofilmes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur naturforschung section**, Tübingen, v.50, n.3- 4, p.167–172, 1995.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology** 100: 114-117, 2005.

CIRASINO, L.; P ISATI, A.; FASANI, F. Contact dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**, v.16, n.2, p.110-111, 1987.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v.284, p. 1318-1322, 1999.

CRISAN, I. et al. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romanian Journal of Virology**, Bucareste, v.46, n.3-4, p.115-33, 1995.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington, D.C.: ASM Press, p. 264, 1999.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.64, n.3, p.235 – 240, 1999.

MARCUCCI, M. C.; DE CAMARGO, F. A.; LOPES, C. M. A et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.74, n.2, p.105–112, 2001.

MARQUES, C.S. **Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFLA (Universidade Federal de Lavras). 2005.

MONTI, M.; BERTI, E.; C ARMINATI, G.; CUSINI, M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**. v.9, n.2, p.163, 1983.

SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; 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 de Farmacognosia**, v.18, p.84-89, 2008.

STANLEY, N.R.; LAZAZZERA, B.A. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **Molecular Microbiology**., Oxford, v.52, n.4, p.917-924, 2004.