

## Atividade "in vitro" da Própolis Verde e Própolis Marrom frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite bovino

CRISTINA MENDES PETER<sup>1</sup>; TONY PICOLI<sup>2</sup>; GIULIA LATOSINSKI<sup>2</sup>; NATHALIA SOUZA<sup>2</sup>; JOÃO LUIZ ZANI<sup>2</sup>; GEFERSON FISCHER<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional - Universidade Federal de Pelotas - cristina\_peter@hotmail.com.

<sup>2</sup>Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional- Universidade Federal de Pelotas – jluizzani@ig.com.br; picolivet@gmail.com; giuliasl@hotmail.com; anathisouza@gmail.com.

<sup>3</sup>Laboratório de Virologia e Imunologia Animal – Universidade Federal de Pelotas - geferson.fischer@gmail.com.

### 1. INTRODUÇÃO

Na produção e industrialização do leite, um dos fatores que mais reduz a qualidade e a quantidade do produto é a mastite (SAEKI et al., 2011). Esta é uma reação inflamatória da glândula mamária, causada por agentes de natureza infecciosa, tóxica ou traumática, sendo essa a enfermidade mais prevalente dos bovinos leiteiros.

O *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos de maior incidência nos rebanhos. Os principais reservatórios deste micro-organismo são os quartos mamários infectados e a pele do úbere e tetos (FONTANA et al., 2010). Infecções intramamárias causadas por este agente causam grande preocupação devido a produção de toxinas que contribuem para a patogênese da mastite. Além disso, esses micro-organismos representam um problema de saúde pública, uma vez que mesmo pasteurizado, o leite pode apresentar enterotoxinas termoestáveis, causando distúrbios alimentares nos consumidores (ANDRADE, 2010).

A própolis é uma substância resinosa natural, colhida pelas abelhas melíferas em diferentes partes das plantas como brotos, botões florais e exsudatos resinosos. Quimicamente complexa, a própolis é composta por mais de 300 substâncias diferentes (BURDOCK, 1998), possui várias outras propriedades bioativas como ação antiviral (BURDOCK, 1998; FISCHER et al., 2005), antiinflamatória (PAULINO et al., 2002), antioxidante, antiparasitária (DECASTRO et al., 1995) e anticarcinogênica (ORSOLIC, 2003). Além disso, um número significativo de trabalhos tem demonstrado a ação inibidora "in vitro", de diferentes extratos de própolis sobre bactérias Gram positivas e, em menor proporção, sobre bactérias Gram negativas (PARK et al., 1998; PINTO et al. 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino frente aos extratos hidroalcoólicos de própolis verde e própolis marrom.

### 2. METODOLOGIA

#### Isolamento de *Staphylococcus aureus*

Foram isolados e caracterizados *Staphylococcus aureus* causadores da mastite bovina, a partir de amostras de leite coletadas de tanques de refrigeração em propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul. A caracterização das cepas bacterianas foi realizada conforme KRIEG & HOLT (1994). O número amostral foi de 64 cepas da espécie *Staphylococcus aureus*.

## Preparo e Análise dos extratos alcoólicos de própolis verde e própolis marrom

Os extratos hidroalcoólicos foram preparados conforme PAULINO et al. (2002). Resumidamente, as amostras de própolis foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior trituração. A extração foi realizada em solução contendo álcool 96° GL, sob agitação por 24 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após, o solvente foi evaporado e a matéria seca resultante, dissolvida em tampão fosfato (pH 6,2), numa concentração final de 100 mg/ml.

### Avaliação da atividade antimicrobiana “in vitro” dos extratos de própolis

Para a determinação do efeito antimicrobiano dos extratos de própolis foi adotada a metodologia de diluição em caldo (Murray et al., 1999). Os extratos foram diluídos sucessivas vezes em microplacas de poliestireno, com caldo Müller Hinton duplo nas concentrações de 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL. Culturas puras de *Staphylococcus aureus*, em Agar sangue, foram diluídas em salina estéril na turbidez 0,5 da escala de Mac Farland e acrescentadas a cada diluição do extrato de própolis, para uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Todas as cepas bacterianas foram testadas em duplicata. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) considerou-se a maior diluição em que não ocorreu turbidez do meio após 24-48h de incubação à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . As análises estatísticas dos resultados de inibições bacterianas (I) e não inibições bacterianas (NI) foram feitas utilizando Teste de Qui-Quadrado, através do software Bioestat 5.3®.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de própolis verde e marrom sob as 64 cepas de *Staphylococcus aureus* testadas, encontram-se na Figura 1.

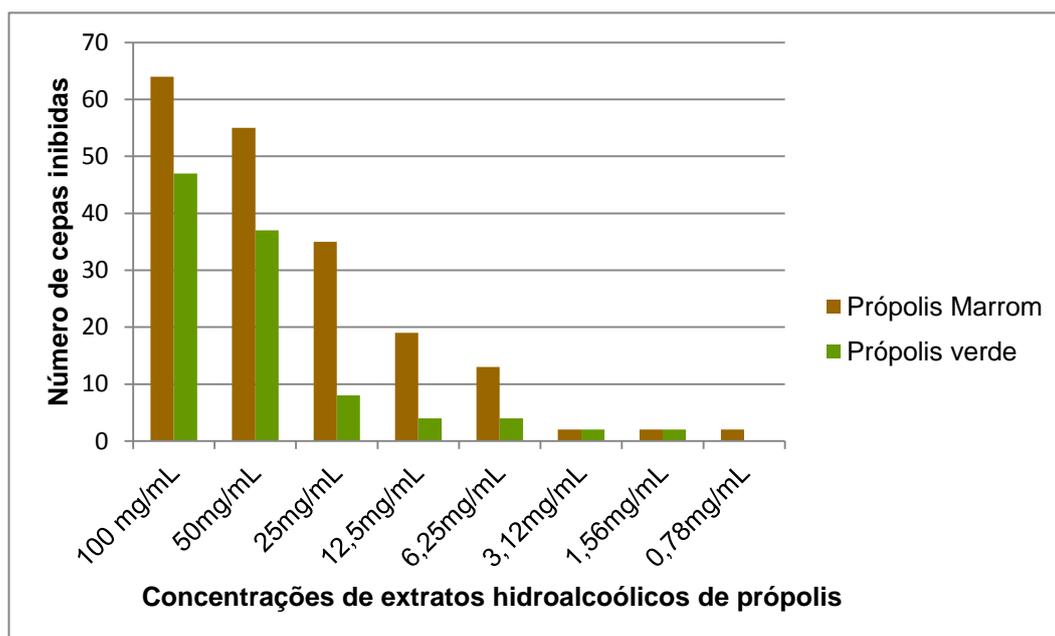


Figura 1. Atividade bactericida da própolis marrom e própolis verde frente a diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*.

Pode-se observar que a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da própolis marrom sob os *Staphylococcus aureus*, na concentração 100 mg/mL inibiu (I) todas os *S. aureus* testados, e a concentração de 50 mg/mL inibiu 85,9% das cepas testadas ( $p < 0,001$ ). Ainda nas concentrações 25 mg/mL (54,6%), 12,5 mg/mL (29,6%), 6,25 mg/mL (20,3%), 3,12 mg/mL (3,12%), 1,56 mg/mL (3,12%) e 0,78 mg/mL (3,12%) observou-se redução no crescimento bacteriano. Diante dos resultados, nota-se o poder de ação bactericida da própolis marrom perante o agente *Staphylococcus aureus*, sobretudo a ação nas concentrações 100 e 50 mg/mL.

A ação antimicrobiana da própolis para a bactéria *Staphylococcus aureus* já havia relatada por Endler et al. (2003) e Pinto et al. (2001). Segundo Auricchio et al., (2006), a ação deve-se à presença de flavonóides, que são solubilizados em meio alcoólico, além de outros princípios ativos que sinergicamente contribuem para esta atividade.

O extrato de própolis verde na concentração 100 mg/mL, inibiu 47 das 64 cepas testadas (73,4%), enquanto que na concentração de 50 mg/mL houve inibição de 37 cepas (57,8%) ( $p < 0,02$ ). Nas demais concentrações não ocorreu inibição significativa: 25 mg/mL (12,5%), 12,5 mg/mL (6,2%), 6,25 mg/mL (6,2%), 3,12 mg/mL (3,1%), 1,56 mg/mL (3,1%) e 0,78 mg/mL (0%).

Os melhores resultados de inibições parecem ser do extrato de própolis marrom em relação ao verde, porém, não se observou diferença estatística significativa entre os dois extratos de própolis.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os obtidos por Langoni (1996), que em seus estudos utilizando extrato de própolis, obteve 100 % de inibição ao *Staphylococcus aureus*. Além disso, Loguercio et al., (2006) obtiveram resultados de sensibilidade média ao extrato de própolis dos isolados de *Staphylococcus coagulase-positivos* de 94,4%.

#### 4. CONCLUSÕES

Os extratos hidroalcoólicos de própolis verde e marrom inibem de forma significativa o *S. aureus* isolados de leite bovino nas concentrações de 100 e 50 mg/mL.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, U.V.C. Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. 85p.
- AURICCHIO, M.T., BUGNO, A., ALMODÓVAR, A.A.B.; PEREIRA T.C. 2006. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. 65(3): 209-212.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem Toxicol**, 36, p.347-463, 1998.
- DECASTRO, S.L.; HIGASHI, K. Effect of different formulation of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Ethnopharmacol** 46, p.55-58, 1995.
- DRESCHER, G., MATTIELLO, S.P., PEIXOTO, R.M., VARGAS, A.C., MACIEL M.N. ; COSTA, M.M.; 2010. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade

- aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciênc. Anim. Bras.** 11(1): 188-193.
- ENDLER, A.L.; OLIVEIRA, S.C.; AMORIM, C.A.; CARVALHO, M.P.; PILEGGI, M. 2003. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. **Publ. Uepg ciências biológicas e da saúde.** 9(2):17-20.
- FISCHER, G.; DUMMER, L.A.; VIDOR, T.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S. **Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarreia Viral Bovina.** In: Encontro de Pós-Graduação, 7, Pelotas. Anais, 2005.
- FONTANA, V.L.D.S., GIANNINI, M.J.S.M., LEITE, C.Q.F., MIRANDA, E.T., ALMEIDA, A.M.F., FONTANA, C.A.P., SOUZA, C.M.; STELLA, A.E. 2010. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da  $\beta$ - lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Revista Veterinária e Zootecnia** 17(4): 552-559.
- KRIEG, N.R. & HOLT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: 9 ed. Williams & Williams, 1268 p. 1994.
- LANGONI, H., DOMINGUES, P.F., FUNARI, S.R.C., CHANDE, C.G. & NEVES I.R. 1996. Efeito antimicrobiano "in vitro" da própolis. **Arq. Bras. Vet. Zoot.** 48:227-229.
- LOGUERCIO, A.P., GROFF, A.N.M., PEDROZZO, A.F., WITT, N.M., SILVA, M.S. & VARGAS A.C. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. 2006. **Pesq. agropec. bras.** Brasília. 41(2):347-349.
- ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **J Ethnopharmacol** 84, p.265-273, 2003.
- MURRAY. P.R; BARON, E.J; PFALLER, M.A; TENOVER, F.C; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical Microbiology.** 7 ed. Washington. American Society for Microbiology Press. 1773 p. 1999.
- PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Rev. de Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998.
- PAULINO, N.; SCREMIN, F.M.; RAICHASKI, L.B.; MARCUCCI, M.C.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea in-vitro. **J Pharm Pharmacol** 54, p.1-9, 2002.
- PINTO M.S.; FARIA J.E.; MESSAGE D.; CASSINI S.T.; PEREIRA C.S.; GIOSO M.M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz. J.Vet.Res.Anim. Sci.** São Paulo, v.38, n.6, p.278-283, 2001.
- SAEKI, E.K.; PEIXOTO, E.C.T. de.; MATSUMOTO, L.S.; MARCUSSO, P.F.; MONTEIRO, R.M.; Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcóolico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.3, p.284-290, 2011.