

INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Staphylococcus aureus* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO A EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS VERDE E MARROM

**GIULIA SOARES LATOSINSKI¹; TONY PICOLI²; CRISTINA MENDES PETER²;
 IVE FRANCESCA TROCCOLI HEPPER¹; GEFERSON FISCHER³; JOÃO LUÍZ
 ZANI³**

¹Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – giuliasl@hotmail.com;
 ivehepper@yahoo.com.br

²Programa de Pós-graduação em Veterinária, UFPel – picolivet@gmail.com;
 cristina_peter@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma resina natural, coletada pelas abelhas através de diversas partes da planta, brotos e exsudatos resinosos (GHISALBERTI, 1979). Sua composição é variável de acordo com a espécie vegetal coletada, sazonalidade e espécie de abelha (BANKOVA, 2005). A coloração varia de acordo com sua procedência, podendo ser marrom escuro, esverdeada ou marrom avermelhado e odor característico, que pode variar (MARCUCCI, 1996). Mais de 200 componentes já foram identificados em diferentes amostras de própolis (BANKOVA et al., 2000) e conferem propriedades biológicas já descritas em literatura, como atividade antiviral, antifúngica, antiprotzoária, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, dentre outras (MARCUCCI, 1996; MONTPIED et al., 2003; GHISALBERTI, 1979; KUMAZAWA et al., 2004). Quanto a sua ação antimicrobiana é conhecido que a presença da própolis inibi o crescimento bacteriano de diversas espécies Gram positivas e Gram negativas (MARCUCCI, 1996).

Os *Staphylococcus aureus* são cocos Gram positivos, catalase positiva, coagulase positiva, hemolíticos, produzem acetoina além de ter a capacidade de fermentar o manitol, maltose e trealose com produção de ácido (QUINN et al., 2005). É um dos micro-organismos que mais causam prejuízos na produção leiteira, pois é tido como o patógeno de maior relevância na etiologia da mastite bovina. Além disso, representa perigo à saúde pública, pois alimentos contaminados por suas toxinas podem causar gastroenterites alimentares, através do leite produzido por um quarto mamário infectado (ZECCONI & HAHN, 2000).

Um crescente aumento na resistência a antimicrobianos vem sendo associado a este micro-organismo ao longo do tempo, e isso pode ser atribuído ao uso indiscriminado e inadequado dos fármacos (Costa, 1996). BRITO (2001) relata que os antibióticos β -lactâmicos fazem parte do grupo cujos estafilococos apresentam maior resistência. Além disso, há uma preocupação crescendo por parte dos consumidores com resíduos de antimicrobianos que podem estar presente nos alimentos, fato esse que levaria a uma seleção de micro-organismos resistentes e colocaria em xeque os tratamentos disponíveis. Por esse motivo há uma demanda cada vez maior por métodos alternativos aos antibióticos no tratamento e prevenção de enfermidades e os compostos naturais estão cada vez mais presentes em medicina veterinária. Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo estabelecer o período necessário para que, bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* sejam inativadas em contato com extratos etanólicos de própolis verde e marrom.

2. METODOLOGIA

As amostras de própolis verde e marrom foram coletadas de colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera*, trituradas e imersas em álcool etílico absoluto na proporção de uma parte de própolis para 3 partes de álcool para retirada de seus compostos bioativos e, sob agitação, permaneceu durante 48 horas sob temperatura de 37°C. O composto foi filtrado e rotaevaporado para retirada do álcool e, a concentração foi obtida através da diferença das pesagens de 2 gramas do composto antes e depois de sua exposição à temperatura de 100°C durante duas horas. O composto foi diluído em água destilada estéril até a concentração de 2,5%.

A cepa de *S. aureus* utilizada foi ATCC 12600. Foi realizada semeadura em meio de cultura e as colônias obtidas após 24 horas de incubação à 37°C foram suspensas em solução salina estéril a 0,85% até turbidez ajustada sob a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL). Essa suspensão sofreu 3 diluições seriadas na base 10 e foi colocada em contato com as soluções de própolis. Dois tubos contendo solução de própolis verde 2,5% mais inóculo bacteriano e 2 tubos contendo solução de própolis marrom 2,5% mais inóculo bacteriano foram incubados a 37°C. Desses tubos foram coletadas amostras em 8 momentos, que foram semeadas em triplicata: zero minutos (apenas suspensão bacteriana), 15 minutos, 30 minutos, 01 hora, 02 horas, 03 horas, 04 horas, 05 horas e 06 horas.

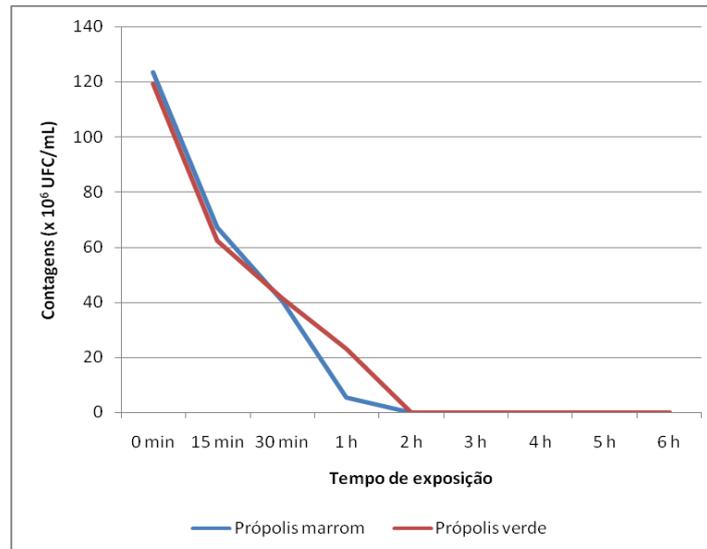
As semeaduras procederam após mais duas diluições seriadas na base 10. Foram semeados 01 mL em placas contendo Agar PCA (Plate Count Agar) utilizando a técnica pour-plate. Após 24 horas de incubação, as placas foram submetidas a contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) e os resultados foram analisados com auxílio do software estatístico BioEstat versão 5.3, através de análise de variância e comparação entre médias pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O poder antibacteriano da própolis não é mais novidade atualmente, buscando-se o conhecimento de seus compostos químicos mais ativos e, ligado a isso, as melhores concentrações a serem utilizadas e, em determinados casos, o tempo de exposição. Neste trabalho, o tempo de exposição de *S. aureus* frente à extratos etanólicos de própolis verde e marrom, na concentração 2,5%, foi controlado e, a Figura 1 demonstra a queda nas contagens do micro-organismos em função do tempo de exposição. Nota-se que, o inóculo inicial continha aproximadamente $1,2 \times 10^8$ UFC/mL e ao passar de apenas 15 minutos, as contagens caíram aproximadamente 50%, atingindo $6,7 \times 10^7$ UFC/mL com exposição frente ao extrato de própolis marrom e $6,2 \times 10^7$ UFC/mL frente ao extrato de própolis verde. Comparando a ação dos dois tipos de própolis aos primeiros 15 minutos, não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

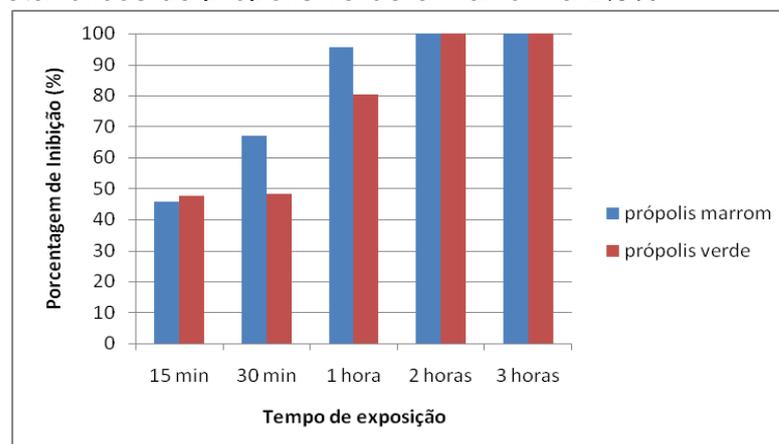
Ao passar de duas horas de exposição, a própolis marrom já não apresentou contagens, ao passo que a própolis verde apresentou média de contagem igual a 5×10^4 UFC/mL e houve diferença estatística entre os extratos ($p < 0,05$). Às três horas de incubação já não houve crescimento em nenhuma placa semeada. A Figura 2 demonstra a inibição do crescimento de *S. aureus* em função do tempo e expressas em porcentagem.

Figura 1. Contagens de *Staphylococcus aureus* em função do tempo de exposição à extratos etanólicos de própolis verde e marrom a 2,5%



Quanto ao própolis marrom, houve diferença estatística em relação à amostra pura, a partir de 30 minutos de exposição ($p < 0,01$) e quanto ao verde a diferença ocorre a partir de uma hora de exposição ($p < 0,01$). Aparentemente, o extrato etanólico de própolis marrom tem uma eficácia ligeiramente maior que o extrato de própolis verde. Cabe salientar, que a região de coleta e a vegetação do local influem na composição e concentrações de princípios bioativos da própolis.

Figura 2. Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* em função do tempo de exposição à extratos etanólicos de própolis verde e marrom a 2,5%



Costa et al. (2009) não encontrou diferenças entre o uso de própolis a 1% e o uso de soluções cloradas na desinfecção de hortaliças e, Hoepers et al. (2011), ao estudar os efeitos desinfetantes da própolis em quartos mamários de vacas em lactação, relatou que 100 μ L de extrato de própolis a 35% utilizado isoladamente na desinfecção externa dos tetos pode ser recomendado, uma vez que foi capaz de inibir 100% do crescimento microbiano, além de diminuir a ocorrência da mastite subclínica nos rebanhos.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, conclui-se que extratos etanólicos de própolis a 2,5% têm ação bactericida sobre *S. aureus* inibindo totalmente seu

crescimento após 2 e 3 horas de exposição (própolis marrom e verde, respectivamente).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L. DE; MARCUCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.

COSTA, E. O, MANGERONA, A. M., BENITS, N.R. et al. Avaliação de campo de quatro tratamentos intramamários de mastite clínica bovina. **A hora Veterinária**, ano 16, n.93, p.19-21, 1996.

COSTA, J. A M.; MITTARAQUISI, A. S. P.; FURTADO, M.C.; CARVALHO, L. M.; CARNELOSSI, M. A. G. Efeito da sanitização na qualidade microbiológica do manjeriço. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p.3411-3418, 2009

GHISALBERTI, E. L. Própolis: a review. **Bee World**, Cardiff, v.60, n.2, p.59-84, 1979.

HOEPERS, C.A.; SILVA, B.T.; MARCUSSO, P.F.; COSENZA, G.R.; PORTO, E.P.; MATSUMOTO, L.S.; PEIXOTO, E.C.T.M. Utilização de Própolis no controle da mastite bovina: desinfecção e selante de tetos. 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. In: **Anais...**, Florianópolis, 2011.

KUMAZAWA, S. et al. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Oxon, v.84, n.3, p.329-339, 2004.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. **Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis**, Quím. Nova. São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MONTPIED, P. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v.115, n.2, p.111-120, 2003

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15-18, 2000.