

Interação Farmacológica da própolis verde e cefalotina frente à isolados de *Escherichia coli*

SUZANE OLACHEA ALLEND¹; LISIANE MARTINS VOLÇÃO²; MICHEL QUEVEDO FAGUNDES²; ANDREA VON GROLL²; PEDRO EDUARDO ALMEIDA DA SILVA²; DANIELA FERNANDES RAMOS³

¹ Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil - suzane_olachea@yahoo.com.br

² Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil – lisivolcao@hotmail.com

² Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil – michelqf@gmail.com

² Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil – avongrol@hotmail.com

² Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil - pedrefurg@gmail.com

³ Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil - daniferamos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli, um bacilo gram-negativo da família Enterobacteriaceae presente no trato intestinal, é considerada o micro-organismo invasor mais comum das vias urinárias e causadora de cerca de 70% a 90% das infecções urinárias (ESMERINO et al., 2003; BRAIOS et al., 2009).

As infecções urinárias, geralmente, são suscetíveis ao tratamento com antimicrobianos, entretanto muitas enterobactérias têm desenvolvido diversos mecanismos de resistência, entre os quais podemos citar a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) como um dos mais importantes. A atividade destas enzimas, através da degradação dos β -lactâmicos, confere a algumas bactérias, resistência a diversas drogas antimicrobianas, tais como as cefalosporinas, utilizadas frequentemente no tratamento destas infecções (LAGO et al., 2010; MEYER; PICOLI, 2011).

O aumento rápido e contínuo da resistência antimicrobiana em micro-organismos de importância clínica, como é o caso da *E.coli*, tem representado uma ameaça no controle destas infecções, devido à escassez de alternativas terapêuticas (BRITO; CORDEIRO, 2012). Além disso, tem estimulado a busca por novas terapias capazes de combater esses micro-organismos resistentes.

O uso de produtos naturais, devido à vasta biodiversidade existente no mundo, tem sido apontado como uma importante ferramenta, devido ao seu amplo potencial tanto para o desenvolvimento de compostos com atividade antimicrobiana *per se* quanto pela possível atividade inibitória e/ou adjuvante de mecanismos de resistência (CRAGG et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2000; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A própolis verde é um produto de origem natural que tem sido utilizado na medicina popular e já teve suas propriedades antimicrobianas, antioxidante, antiinflamatórias identificadas (JÚNIOR et al., 2006). No entanto, poucos estudos avaliaram extratos de própolis frente micro-organismos resistentes, bem como a sua atividade adjuvante no tratamento de infecções urinárias causadas por cepas de *E.coli*.

Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar *in vitro* a interação farmacológica do extrato alcoólico da própolis verde e de uma cefalosporina de primeira geração frente a isolados sensíveis e resistentes de *Escherichia coli*.

2. METODOLOGIA

Quatro isolados clínicos de *E.coli* oriundos de pacientes com infecção urinária atendidos no Hospital Universitário Dr. Riet Corrêa Jr. (HU - FURG) e uma cepa padrão de *E.coli* (ATCC 25922), foram selecionados para esse estudo, considerando seu perfil de sensibilidade às cefalosporinas e a produção de ESBLs, previamente identificadas, pelo Laboratório de Análises Clínicas do HU-FURG, através do sistema Phoenix.

A concentração mínima inibitória (CIM) do extrato de própolis verde foi determinada pelo método de microdiluição em placa conforme proposto no documento M7-A06 da NCCLS (2010). Foram adicionados 100µL de meio Muller Hinton (MH) em cada poço de teste e 100µL do extrato ou cefalotina a uma concentração inicial de 200 e 25 µg/mL, respectivamente. Posteriormente, foi realizada a microdiluição seriada 1:2, e adicionado o inóculo bacteriano de cada isolado avaliado, na proporção 1:20 em MH, garantindo uma turbidez correspondente a escala 0,5 McFarland.

A fim de avaliar o efeito combinado do extrato de própolis associado a cefalotina, foi realizado o método de checkerboard conforme proposto por PILLAI e MOELLERING (2005). Nas microplacas foram acrescentados 50µL de meio MH em todos os poços, em seguida adicionados 50µL de cefalotina a uma concentração inicial de 25 µg/mL e realizada a diluição seriada 1:2, de maneira a obter concentrações que variaram de 25 a 0,39 µg/mL. Após foi adicionado 50µL de própolis em diluições seriadas que variaram de 200 a 3,12 µg/mL e, finalmente, adicionados 100µL inóculo bacteriano.

A placa foi incubada em estufa por 24h/37°C, passado o período de incubação, foram acrescentados 30µL rezasurina 0,02% que atua como indicador de viabilidade celular através de uma reação de oxiredução. A CIM foi definida como a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano.

A interpretação dos resultados do checkerboard se deu através do índice de concentração fracional inibitória (FICI) obtida através da seguinte fórmula: $FICI = (CIM \text{ do extrato de própolis verde combinado} / CIM \text{ do extrato de própolis verde sozinho}) + (CIM \text{ da cefalotina combinada} / CIM \text{ da cefalotina sozinho})$. Os resultados do FICI foram interpretados da seguinte forma: $FICI \leq 0,5 =$ SINERGISMO; $0,5 < FICI \leq 1 =$ ADITIVIDADE; $1 < FICI \leq 2 =$ INDIFERENÇA e $FICI > 2 =$ ANTAGONISMO.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis tem sido amplamente investigada contra diversas bactérias, principalmente frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Porém, neste estudo, o extrato alcoólico da própolis verde não foi ativo a 200µg/ml frente às cepas de *E.coli* testadas, indicando que possivelmente, a própolis avaliada tenha um estreito espectro de ação relacionado principalmente a micro-organismos gram-positivos, como já identificado por Stepanović et al. 2003; Júnior et al., 2005; Waili et al., 2012; Wojtyczka et al., 2013.

Além disso, previamente, foi identificado que a atividade antibacteriana da própolis poderia ser influenciada pela variação de composição química, a qual está intimamente relacionada aos aspectos geográficos, climáticos e a espécie de planta que está associada (WAILI et al. 2012). Portanto, os resultados encontrados em relação a atividade antimicrobiana da própolis verde, neste trabalho, poderiam ser explicados devido as diferenças de composição da própolis que foi avaliada no trabalho de Monzote et al. (2012) em relação ao extrato testado em nosso estudo.

Com relação à presença de enzima produtora de β -lactamases nos isolados avaliados não foram observadas diferenças na atividade da própolis verde sozinha e em associação a cefalotina. Indicando que esse extrato possivelmente não atua inibindo a produção da enzima.

Para isolados previamente identificados como sensíveis a cefalosporinas de primeira geração, a própolis verde mostrou-se antagônica a cefalotina com FICI de 3 (Tabela 1). Já para os isolados resistentes a cefalotina o FICI foi de 2 (indiferença), indicando que o extrato da própolis não favoreceu a atividade da cefalosporina testada.

Tabela 1- Resultados da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Checkerboard de cefalotina e própolis frente à *Escherichia coli*

Isolados	ESBL	Sensível/ Resistente	CIM cefalotina $\mu\text{g/mL}$	CIM própolis $\mu\text{g/mL}$	Combinado $\mu\text{g/ML}$	FICI	FICI
<i>E. coli</i> ATCC	NÃO	S	12,5	>200	>200/25	3	ANT
Isolado 1	NÃO	S	12,5	>200	>200/25	3	ANT
Isolado 2	NÃO	R	>25	>200	>200/25	2	IND
Isolado 3	SIM	R	>25	>200	>200/25	2	IND
Isolado 4	SIM	R	>25	>200	>200/25	2	IND

E. coli - *Escherichia coli*; S-sensível a cefalosporinas de primeira geração; R-resistente a cefalosporinas de primeira geração; ANT-antagônico; IND-indiferente; CIM- concentração inibitória mínima; FICI- Concentração fracional mínima.

Stepanovié et al., (2003) apontam que diferentes amostras de própolis podem mostrar diferentes potenciais de ação quando em associação a antimicrobianos. Alguns estudos *in vitro* têm evidenciado o sinergismo ou a falta dele entre extratos de própolis e alguns antimicrobianos (WOJTYCZKA et al., 2013; JÚNIOR et al., 2005), corroborando com os nossos resultados de checkerboard.

Considerando que o efeito sinérgico da própolis já identificado por outros autores (WOJTYCZKA et al., 2013; JÚNIOR et al., 2005), frequentemente, estava associados a antimicrobianos envolvidos na interferência da síntese protéica e que a cefalosporina atua na inibição da parede celular, isso poderia justificar a ausência de sinergismo entre o extrato testado e cefalotina nos isolados de *E.coli*.

Sendo assim, a avaliação de outras espécies bacterianas bem como outros antimicrobianos poderia evidenciar uma melhor atividade do extrato alcoólico de própolis verde quando associado a fármacos já utilizados no tratamento de infecções urinárias.

4. CONCLUSÕES

O extrato alcoólico da própolis verde associado a cefalotina não apresentou atividade sinérgica frente aos cinco isolados de *E.coli* avaliados neste estudo, indicando que a própolis verde não apresenta um efeito adjuvante no tratamento com cefalosporinas de primeira geração em infecções urinárias causadas por esse micro-organismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, K. C. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Revista de Pesquisa Inovadora de Farmácia**, v.3, n. 1, p. 9-14, São Paulo, 2011.
- BRAIOS, A.; TURATTI, T. F.; MEREDIJA, L. C. S.; CAMPOS, T. R. S.; DENADAI, F. H. M. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados:

etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Goiás, v. 45, n.6, p. 449-456, 2009.

BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidades de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Niterói, v. 48, n.4, p. 247-249, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p.52-60, 1997.

ESMERINO, L. A.; GONÇALVES, L. G.; SCHELESKY, M. E. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 9, n. 1, p. 31-39, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n. 3, p. 667-679, 2010.

JÚNIOR, A. F.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J.E.C.; ORSI, R. O.; CUNHA, M. L. R. S.; MONTELLI, A. C. Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 563-566, Rio de Janeiro, 2005.

JÚNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n.1, p.294-297, Santa Maria, 2006.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

MEYER, G.; PICOLI, S.U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Novo Hamburgo, v. 47, n.1, p. 25-31, 2011.

MONZOTE, L.; RUBIO, O. C.; FERNANDEZ, M. C.; HERNANDEZ, I. M.; FRAGA, J.; PEREZ, K.; KERTENS, M.; MAES, L.; COS, P. In vitro antimicrobial assessment of cuban propolis extracts. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.8, p.978-984, Rio de Janeiro, 2012.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G. L. Atividade antibacteriana de extratos vegetais e fitoquímicos de bactérias resistentes aos antibióticos. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, São Paulo, 2000.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility testes for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, 2010.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. **Antibiotics in laboratory medicine**. Philadelphia. Lippincott Williams e wilkins, 2005.

STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I.; VLAHOVIĆ, M. S. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v. 158, p. 353-357, Belgrade, 2003.

WAILI, N. A.; GHAMDI, A. A.; ANSARI, M. J.; ATTAL, Y. A.; SALOM, K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans isolates in single and polymicrobial cultures. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 9, p. 793-800, 2012.

WOJTYCZKA, R. D.; DZIEDZIE, A.; IDZIK, D.; KEPA, M.; KUBINA, R.; DZIK, A. K.; DZIRBA, J. S.; STOJKO, J.; SAJEWIEZ, M.; WASIK, T. Susceptibility of Staphylococcus aureus clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, p. 9623-9640, 2013.