

Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis

Antimicrobial activity and quantification of Flavonoids and Phenolics in different extract of Propolis

Keily Alves de Moura Oliveira^{1*}; Glauco Vieira oliveira²; Claudemir Batalini³; Juliana Aline Rosalem⁴; Luciana Silva Ribeiro⁵

Resumo

A própolis, um produto resinoso coletado por abelhas, de diferentes exsudados vegetais, é útil na manutenção e segurança da colmeia. Essa substância tem despertado o interesse de muitos pesquisadores devido às suas inúmeras propriedades terapêuticas, tais como anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, antimicrobiana, anestésica, anticancerígena, dentre outras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana in vitro de três marcas de extrato de própolis comercializadas em Barra do Garças - MT em diferentes patógenos humanos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*), bem como realizar algumas análises preconizadas pelo Ministério da Agricultura (características organolépticas, atividade antioxidante e teor de flavonoides e fenóis totais) dos mesmos extratos. Os resultados permitiram observar que as três amostras avaliadas se apresentaram adequadas quanto ao aroma, cor e sabor que caracterizam os extratos de própolis. Quanto à determinação espectrofotométrica quantitativa, o teor de flavonoides e fenóis totais apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Com relação à atividade antioxidante, as médias dos valores encontrados ultrapassaram o valor exigido pelo regulamento técnico para identidade e qualidade dos extratos de própolis, demonstrando que os extratos não tinham marcante atividade redutora. A caracterização de alguns constituintes fitoquímicos nas amostras permitiu demonstrar a possível presença de flavonoides (confirmada na quantificação) e taninos condensados. Observou-se que nenhum dos extratos de própolis apresentou inibição ao crescimento dos patógenos testados.

Palavras-chaves: Extrato de própolis. Atividade antimicrobiana. Flavonoides. Fenóis.

Abstract

The propolis, the resinous hive product collected by bees, from different plants exudates, is responsible for maintenance and safety of honeycombs. This substance has attracted the attention of many researchers

^{1*} Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFV), Professora Adjunta do Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Mato Grosso – Campus Universitário do Araguaia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Av. Universitária nº 3500, Parque Universitário, Pontal do Araguaia, Mato Grosso, Brasil, 78698-000, Tel. (66) 3401-4668; e-mail: keilyam@ufmt.br.

²Doutor em Genética e Melhoramento (UFV), Professor Adjunto do Curso de Agronomia, Universidade Federal do Mato Grosso – Campus Universitário do Araguaia, Departamento de Agronomia, Av. Universitária nº 3500, Parque Universitário, Pontal do Araguaia, Mato Grosso, Brasil, 78698-000

³Doutor em Química Orgânica (USP), Professor Adjunto do Curso de Química, Universidade Federal do Mato Grosso – Campus Universitário do Araguaia, Departamento de Química, Av. Universitária nº 3500, Parque Universitário, Pontal do Araguaia, Mato Grosso, Brasil, 78698-000

⁴Graduada do Curso de Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Mato Grosso – Campus Universitário do Araguaia, Departamento de de Farmácia, Av. Universitária nº 3500, Parque Universitário, Pontal do Araguaia, Mato Grosso, Brasil, 78698-000

⁵Mestranda do Curso de Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras – Campus Universitário, Caixa Postal 3037, Lavras – Minas Gerais, Brasil, 37200-000

due several therapeutic properties, such as: anti-inflammatory, antioxidative, anesthetic, antimicrobial, antiulcerative, antitumour, among others. The goal of this work was to evaluate the antimicrobial activity in vitro of three marks extracts of propolis commercialized in Barra do Garças – MT in different microorganisms humans (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*), as well as to accomplish some analysis in accordance with the Brazilian Agricultural Ministry recommendations (organoleptic characteristics, antioxidant activity and flavonoids and total phenolics contents) of the same extracts. The results allowed observing that: the three samples observed showed adequate as to the flavor, color and taste. For the spectrophotometric quantitative determination, the flavonoids and total phenolic contents showed within the standards established by legislation. In the evaluation antioxidant, the values found exceeded the value required by Brazilian Agricultural Ministry for quality and identity of extracts demonstrating that the extracts had no significant reductive activity. The characterization of some constituents wet-chemistry in the samples showed the possible presence of flavonoids and condensed tannins. None of the extracts of propolis inhibited the growth of bacteria pathogenic.

Keywords: Extract of propolis. Antimicrobial activity. Flavonoids. Phenolics.

Introdução

Ao longo da história, os produtos naturais, tanto de origem vegetal como animal, são utilizados e preferencialmente escolhidos pelo homem para fins medicinais. A própolis é um material resinoso complexo composto por substâncias gomosas e balsâmicas, colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudados de plantas ou de outras partes do tecido vegetal, as quais são transportadas até a colmeia para terem sua composição modificada, por meio do acréscimo de secreções salivares das abelhas, ceras, pólen para obtenção do produto final (BRASIL, 2001; GHISALBERTI, 1979; PINTO et al., 2001).

Em geral a própolis é composta de 50% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias (BURDOCK, 1998).

Até o momento, já foram identificados e/ou caracterizados mais de 200 constituintes químicos, dentre os quais: ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, di-hidroflavonóis, etc.), terpenos, esteroides, aldeídos e ácidos aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (BURDOCK, 1998; MARCUCCI et al., 2001; PARK; ALENCAR; MASAHARU, 1999). Algumas vitaminas (B1, B2, B6, C, E) e minerais como manganês, ferro, cálcio e

alumínio também já foram identificados em amostras de própolis (BURDOCK, 1998; MARCUCCI et al., 2001; PARK; ALENCAR; MASAHARU, 1999).

Entre os compostos fenólicos presentes na própolis, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos. Sabe-se que a ingestão de flavonoides interfere em diversos processos fisiológicos, e auxilia na absorção e na ação de vitaminas, por atuar nos processos de cicatrização, como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana (MENEZES, 2005). Pesquisas recentes sugerem que na própolis brasileira os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonoides. Talvez seja essa particularidade um dos fatores responsáveis pela enorme preferência do mercado internacional em relação à própolis produzida no Brasil (FUNARI; FERRO, 2006; MARCUCCI, 1996; ORSI et al., 2005; PARK; ALENCAR; MASAHARU, 1999; PARK et al., 2002).

Ainda que amplamente utilizada na medicina popular, por muito tempo a própolis foi considerada um subproduto das abelhas. Entretanto, o interesse de pesquisadores de todo o mundo vem sendo despertado pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas. Extratos etanólicos, hidroalcoólicos e aquosos da própolis têm sido utilizados e analisados em diversas situações como agentes bactericidas, antivirais, fungicidas, antiinflamatórios, antitripanossomais,

antiparasitários, imunoestimulantes, hepatoprotetores, antioxidantes, cicatrizante, anestésicos e até mesmo anticancerígenos (FUNARI; FERRO, 2006; GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI et al., 2001; VARGAS et al., 2004).

Em relação às suas propriedades farmacológicas, vários trabalhos nacionais e internacionais demonstram a diversidade de atividades biológicas da própolis e, dentre elas, a antimicrobiana. A ação bacteriostática e bactericida in vitro dos extratos de própolis tem sido testada em diferentes linhagens de bactérias (KORU et al., 2007; ORSI et al., 2005; TORRES et al., 2000). Os trabalhos apontam uma acentuada atividade da própolis principalmente contra bactérias Gram-positivas e ação limitada contra Gram-negativas. A menor sensibilidade das Gram-negativas deve-se provavelmente às diferenças na constituição química da parede celular destas bactérias (MARCUCI et al., 2001; MENEZES, 2005; PINTO et al., 2001; SILVA et al., 2006; VARGAS et al., 2004;). Quanto à ação fungicida, algumas linhagens de fungos, em especial o gênero *Candida*, revelam-se susceptíveis aos extratos de própolis (SFORCIN et al., 2001).

Tanto a própolis bruta quanto o extrato de própolis devem atender a algumas especificações, conforme Ministério da Agricultura e Abastecimento. No Brasil, o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis”, presente na normativa nº. 03, de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura e Abastecimento, visa a manter a qualidade do extrato alcoólico de própolis brasileiro e determinar os requisitos mínimos de qualidade destinada ao comércio nacional. Algumas dessas especificações são: determinar características sensoriais como aroma, cor, sabor, aspecto, características físico-químicas como teor mínimo de extrato seco (11% m/v), teor máximo de cera do extrato seco (1% m/m), teor mínimo de flavonoides (0,25% m/m) teor mínimo de compostos fenólicos (0,25% m/m), propriedades antioxidantes (máximo 22 segundos), não autorização de uso de aditivos, critérios macroscópicos e microscópicos,

acondicionamento, rotulagem, dentre outros (BRASIL, 2001).

Os diversos estudos científicos confirmam que a própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente com respeito às atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antineoplásica e antioxidante. A identificação de suas propriedades tempor objetivo, além da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, a agregação de valor econômico à própolis bruta, criando uma fonte econômica de exploração agrícola e extrativismo autossustentável (MENEZES, 2005).

A investigação da constituição química da própolis é fundamental para a associação entre os compostos bioativos presentes nela com as respectivas propriedades farmacológicas. Assim, este trabalho teve como objetivo a avaliação da ação antimicrobiana in vitro de três marcas de extrato de própolis comercializados em Barra do Garças - MT em diferentes patógenos humanos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*), bem como realizar algumas análises preconizadas pelo Ministério da Agricultura (características organolépticas, atividade antioxidante e teor de flavonoides e fenóis totais) dos mesmos extratos.

Material e Métodos

Foram obtidos extratos de própolis de três diferentes marcas (identificadas como A, B e C), comercializados no município de Barra do Garças - MT. As análises microbiológicas e físico-químicas descritas a seguir, foram realizadas nos laboratórios de microbiologia e química, respectivamente, do Campus Universitário do Araguaia/UFMT.

Características organolépticas

Foram realizadas análises sensoriais preconizadas pelo Ministério da Agricultura para a

fixação de identidade e qualidade de própolis, sendo elas: aroma, cor e sabor. Procurou-se expressar os resultados dentro das possibilidades descritas pelo Ministério acima citado, visto que a avaliação é feita por meio dos órgãos do sentido e assumem, portanto, um aspecto subjetivo, próprio do analista (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE APICULTORES CRIADORES DE ABELHAS MELÍFERAS EUROPEIAS, 1999).

Quantificação de flavonoides e fenóis totais

Testes fitoquímicos realizados abaixo visaram a evidenciar algumas classes de substâncias químicas presentes nas amostras, por reações qualitativas, a partir de extratos hidroalcoólicos de própolis com reagentes específicos para cada classe, seguindo os procedimentos de Matos (1998). As classes de substâncias testadas foram: fenóis, taninos hidrolisáveis e condensados, flavonoides, antocianinas e antocianidinas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A identificação de fenóis e taninos foi realizada por meio de reação com solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3), observando a mudança na coloração ou formação de precipitado.

A identificação de antocianinas, antocianidinas e flavonoides foi realizada por meio de acidulação e alcalinização com soluções aquosas de HCl e NaOH, observando a mudança de coloração.

A quantificação de flavonoides e fenóis totais foi feita por espectrofotometria de UV, visível a 425 nm e 760 nm, respectivamente. Para isso, construiu-se uma curva padrão com a quercetina (para análise de flavonoides) e ácido gálico (para análise de fenóis), obtendo-se a equação da reta para o cálculo (em %) dos teores desses metabólitos secundários. Para a curva padrão foram preparadas soluções de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$, com acréscimos de 1 $\mu\text{g/mL}$, tanto para flavonoides, quanto para fenóis preparadas de acordo com Funari e Ferro (2006). Os dados foram submetidos a análise de variância e quando

significativo, foi utilizado o teste Tukey através do programa GENES (CRUZ, 2001).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de cada amostra foi determinada pela análise do índice de oxidação utilizando o permanganato de potássio como agente oxidante. Cada amostra foi diluída para uma concentração final igual a 1,2%, sendo esta pipetada o volume de 0,5 mL deste diluído, 0,5 mL de água destilada, 1 mL de ácido sulfúrico a 20%, misturando-os bem e resfriando-os em banho de gelo até obterem a temperatura de 18 °C. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta, foram acrescentados 50 μL de KMnO_4 0,1 mol/L e ligado o cronômetro, observando o desaparecimento da cor vermelha contra um fundo branco. Foi anotado o tempo decorrido sendo o teste feito em duplicata. O valor médio encontrado foi anotado, desprezando-se a fração, quando houve (SILVA et al., 2006).

Atividade antimicrobiana

Na análise de identificação da atividade antimicrobiana, foram utilizados discos estéreis, aos quais foram aplicadas concentrações de 5%, 10%, 15%, 20%, 30% dos respectivos extratos de própolis e então colocados em placas de Petri para secar em estufa a 60 °C, por aproximadamente 15 minutos, a fim de eliminar qualquer resíduo etanólico. Os discos utilizados como controle negativo foram obtidos pela aplicação de uma solução hidroalcoólica 50% (v/v) sob as mesmas condições de secagem dos tratamentos anteriores. O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com o método de Kirb Bauer ou método de difusão em placa (BROCK et al., 2000). O controle positivo para os patógenos foi feito com o antibiótico cloranfenicol (30,0 μg).

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis, os isolados de *S. aureus* similar ATCC 25923, *S. typhimurium* derivada ATCC 14028, *E. coli* similar ATCC 25922, *C. albicans*

similar ATCC 1-231, obtidas da Coleção de Cepas do Laboratório New Prov, foram reativados em Caldo Brain Heart Infusion (BHI-Oxoid) a 37°C por 48 h, respectivamente. Após a incubação, foi feita uma suspensão dos inóculos em água destilada estéril, para obter-se uma concentração de 10⁸ UFC/mL por comparação com a escala 1 de McFarland.

Após este período, uma alíquota da cultura ativada de cada micro-organismo foi espalhada uniformemente na superfície de placas contendo Ágar Mueller Hinton (Oxoid). Em seguida, os discos com o extrato de própolis foram colocados sobre a superfície da placa com o auxílio de uma pinça estéril em posições equidistantes. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 18 h.

A atividade antimicrobiana foi determinada pela formação de halo inibitório mínimo de 5 mm em consonância ao trabalho de Park et al. (1998).

Resultados e Discussão

Características organolépticas

Os extratos de própolis apresentaram um aroma resinoso e balsâmico característicos, cuja cor variava de amarelo-esverdeado a amarelo-ouro, sabor amargo e picante (Tabela 1). O exame organoléptico dos extratos de própolis merece destaque, pois pode indicar, antecipadamente, algumas características físico-químicas da amostra. Funari e Ferro (2006) ressaltam que a própolis esverdeada (chamada green propolis), típica de algumas localidades da Região Sudeste do Brasil, é a mais bem cotada no mercado internacional, sugerindo que existe uma associação entre sua cor e sua composição química, rica em ácidos fenólicos.

As três amostras observadas se apresentaram adequadas quanto ao aroma, cor e sabor que caracterizam os extratos de própolis, não sendo encontrada discordância quanto às características descritas na legislação vigente para esta análise (BRASIL, 2001).

Tabela 1 – Características organolépticas das três amostras de extratos de própolis comercializados na cidade de Barra do Garças-MT.

	Aroma	Cor	Sabor
Amostra A	Característico	Amarelo-esverdeado	Amargo e picante
Amostra B	Característico	Marrom-avermelhado	Amargo e picante
Amostra C	Característico	Amarelo ouro	Amargo e picante

Fonte: Autores.

Flavonoides, fenóis e outros componentes da própolis

A reação com o FeCl₃, para a determinação de taninos e fenóis promoveu a turvação e mudança de coloração (verde escuro), em todos os extratos, indicando a presença de taninos condensados (Tabela 2). Não foi verificada a presença de fenóis

em nenhum dos extratos. O mecanismo de reação baseia-se na formação de um complexo entre o átomo de ferro e as hidroxilas vizinhas do tanino, que se encontram ligadas ao anel aromático, levando à formação de precipitado corado.

O principal fator relacionado ao mecanismo de ação dos taninos associa-se às suas propriedades

físico-químicas, em particular sua adstringência, isto é, a capacidade de precipitar proteínas, que pode explicar a redução da virulência de muitos vírus na presença de taninos. Nesse sentido, é relevante sua ação inibitória sobre muitas enzimas microbianas (SCALBERT, 1991).

Foi possível observar a presença de algumas classes de flavonoides (flavonas, flavonóis e xantonas). A reação negativa para as antocianinas (pigmentos da classe dos flavonoides) sugere a

ausência ou a baixa concentração dessa classe de constituintes nas amostras de própolis bruta, ou seja, as fontes vegetais visitadas pelas abelhas que produziram essa própolis, provavelmente, não mostraram concentrações satisfatórias destes constituintes (Tabela 2). No entanto, a mudança de coloração que se verificaria, caso estes constituintes estivessem em concentração elevadas, seria devido às variações estruturais, que levam à formação de diferentes cromóforos.

Tabela 2 – Resultado da caracterização das amostras de extratos de própolis comercializados em Barra do Garças-MT.

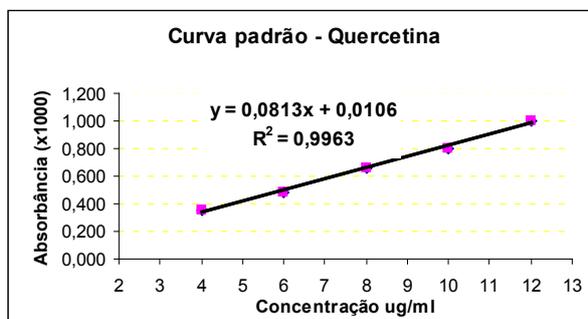
Classe de metabólitos	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Fenóis	-	-	-
Taninos	+	+	+
Antocianinas e Antocianidinas	-	-	-
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	+	+	+
Chalconas e auronas	-	-	-
Flavanonóis	S	S	S

(-) Reação Negativa (+) Reação Positiva (S) Suspeita

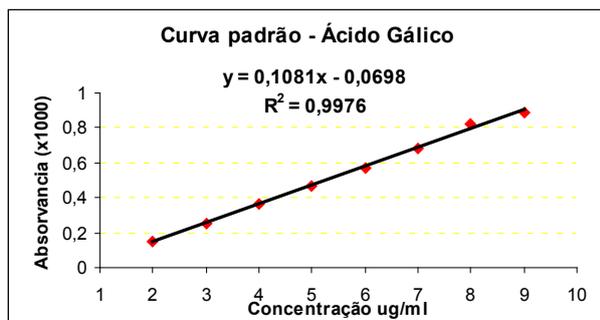
Fonte: Autores.

As figuras 1 e 2 trazem as curvas padrão, com sua respectiva equação da reta, para quercetina e ácido gálico, correspondentes aos teores de flavonoides e fenólicos totais, respectivamente. Os valores de coeficientes de regressão (R^2) acima dos 99% refletem um alto grau de confiabilidade das curvas padrão (figuras 1 e 2), para inferência dos teores de flavonoides e ensaios espectrofotométricos tanto para quercetina quanto para ácido gálico.

Figura 1 - Curva padrão, com sua respectiva equação de reta, para a Quercetina diidratada.



Fonte: Autores.

Figura 2 - Curva padrão, com sua respectiva equação de reta, para o Ácido Gálico.

Fonte: Autores.

A Tabela 3 contém os valores de flavonoides e fenólicos, encontrados nos ensaios espectrofotométricos, para as três amostras de extrato de própolis. De acordo com a legislação em vigor no Brasil, a porcentagem mínima de flavonoides no extrato alcoólico de própolis é de 0,25%. Pode-se observar que todas as amostras apresentam valores superiores a 0,25% e, portanto,

não fogem, quanto a este quesito, da qualidade exigida para comercialização (BRASIL, 2001). Os valores encontrados (1,22%; 1,72%; 0,81%) de flavonoides, expressos como equivalentes de quercetina di-hidratada estão situados dentro uma faixa relatadas em vários trabalhos que variam entre 0,05 – 2,11% (SILVA et al., 2006; SOUZA et al., 2007).

O teor de fenóis totais encontrado nas amostras investigadas (Tabela 3), também atende ao requisito mínimo do Ministério da Agricultura, que é de no mínimo 0,5% para extratos de própolis comerciais (BRASIL, 2001). Funari e Ferro (2006) encontraram valor de 7,39% em uma amostra coletada no Estado de São Paulo, aplicando o mesmo método espectrofotométrico. Já Silva et al. (2006), ao analisarem amostras de própolis da Paraíba, colhida em diferentes épocas do ano, encontraram teores de fenóis entre 2,93 a 8,13%, verificando que os compostos bioativos da própolis podem sofrer variações de acordo com o período de colheita.

Tabela 3 – Resultados das análises de flavonoides e fenólicos totais e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura.

Análise	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Requisito (MAPA)
¹ Teor de Flavonoides	1,22% a	1,72% a	0,81% a	Mínimo 0,25%
² Teor de Fenóis	3,71% a	4,81% a	3,36% a	Mínimo 0,5%

¹ Expressos como equivalente de quercetina, sobre extrato de própolis (m/m).

² Expressos como equivalente de ácido gálico, sobre extrato de própolis (m/m)

³ médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Fonte: Autores.

Na análise fitoquímica, observou-se a presença de taninos condensados e ausência de fenóis. No entanto, deve-se ressaltar que os taninos são polifenóis e, portanto, podem influir na contagem de fenóis totais.

Atividade antioxidante

Na avaliação do índice de oxidação, valores de até 22 segundos indicam atividade antioxidante (SILVA et al., 2006). Esta técnica indica a atividade redutora da própolis, ou seja, qual o tempo necessário que a amostra necessita para exercer o poder antioxidante. Neste trabalho foram encontrados para a amostra A (31 segundos), amostra B (26 segundos) e amostra C

(33 segundos), ultrapassando assim o valor exigido pelo regulamento técnico para identidade e qualidade dos extratos de própolis, sugerida pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001). Portanto, nenhuma das amostras evidenciou atividade antioxidante, demonstrando que os extratos não tinham marcante atividade redutora.

De acordo com a literatura, a atividade antioxidante dos extratos etanólicos e hidroalcoólicos de própolis são conferidos aos flavonoides (PRATT; BIRAC, 1979). No entanto, apesar de as três marcas de extrato apresentarem teor (%) de flavonoides

acima do mínimo requisitado pelo Ministério da Agricultura, não houve atividade antioxidante em nenhuma amostra. Apesar disto, foi observado que o valor do índice de oxidação (em segundos) diminuiu a medida que o teor de flavonoides aumentou.

Atividade antimicrobiana

Na tabela 4 são apresentados os resultados da atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de extratos de própolis.

Tabela 4 – Valor do halo de inibição, em milímetros, de diferentes concentrações (%) de extrato de própolis sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Sa), *Candida albicans* (Ca), *Escherichia coli* (Ec) e *Salmonella typhimurium* (St).

%	Amostra A				Amostra B				Amostra C			
	Sa	Ca	Ec	St	Sa	Ca	Ec	St	Sa	Ca	Ec	St
5	2,7	1,7	1,0	0,5	1,0	1,0	0,5	0,2	1,0	1,0	0,7	1,0
10	3,5	3,5	1,0	1,0	1,5	1,7	0,5	0,2	1,2	1,0	1,0	1,2
15	3,5	3,5	1,2	1,0	1,0	2,0	0,7	0,2	1,7	1,7	1,0	1,2
20	4,0	2,0	1,0	1,0	1,2	2,0	0,7	0,2	1,7	1,2	1,0	1,5
30	4,0	3,2	0,5	1,0	1,2	2,0	1,0	0,5	2,2	1,5	1,2	1,5
Cl	10	1,2	6,0	9,5	12,5	1,0	1,0	1,0	10	2,0	7,5	5,5

Cl- Clorafenicol (30,0µg)

Fonte: Autores.

De forma geral, os extratos de própolis não inibiram o crescimento dos patógenos testados. O maior halo de inibição de 4 mm apresentado por uma das amostras (A), nas concentrações de 20% e 30%, para o patógeno *S. aureus*, não foi suficiente para revelar atividade antibacteriana. Silva et al. (2006) verificaram resultados semelhantes ao observarem que os extratos de própolis não inibiram o crescimento de *C. albicans* e *S. aureus*, fato que

indica que os compostos bioativos das amostras analisadas não têm ação antimicrobiana. Ao analisar a atividade antibacteriana de extratos de própolis sobre *S. aureus*, Park et al. (1998) observaram que apenas concentrações acima de 30% de própolis começaram a apresentar uma ligeira atividade (zona de inibição de 5 mm), e quando utilizados extratos de 60 e 80%, a inibição do crescimento microbiano aumentou consideravelmente (zona de inibição

de 15 mm). Ainda neste sentido, alguns trabalhos têm como proposta a combinação de extrato de própolis com antimicrobianos para a diminuição da dose clínica de determinados antibióticos, bem como reduzir a incidência de efeitos colaterais e ao mesmo tempo potencializar a antibioticoterapia no tratamento das infecções (PINTO et al., 2001; VARGAS et al., 2004).

Sabe-se que a composição química da própolis distingue-se de região para região, e que a proporção dos tipos de substâncias encontradas são variáveis e dependentes dos locais de coleta, influenciando no tipo de ação farmacológica e toxicológica de uma amostra (BURDOCK, 1998). As espécies Gram-negativas avaliadas (*E. coli* e *S. typhimurium*) apresentaram baixa sensibilidade às diferentes concentrações dos extratos. Esse comportamento poderia ser esperado, uma vez que diversos trabalhos relatam que a atividade antibacteriana da própolis é mais efetiva sobre bactérias Gram-positivas, independente do local de coleta da resina (MARCUCCI et al., 2001; MENEZES, 2005; SILVA et al., 2006; VARGAS et al., 2004). A menor sensibilidade das Gram-negativas deve-se provavelmente as diferenças na constituição química da parede celular destas bactérias. Enquanto na parede celular dos gêneros Gram-negativos a quantidade de peptidoglicana se encontra numa fração menor quando comparado ao que ocorre nas bactérias Gram-positivas, o conteúdo lipídico e a complexidade química da parede celular das bactérias Gram-negativas são consideravelmente maiores que nas Gram-positivas (PINTO et al., 2001).

Ao observar os resultados da análise físico-química, percebe-se que não houve relação entre atividade antimicrobiana com os teores de flavonoides e fenóis totais para estes extratos de própolis. Na verdade, todas as amostras se mostraram adequadas em relação à quantidade mínima destes compostos, no entanto, é possível que compostos bioativos responsáveis pela atividade antimicrobiana não estivessem presentes nestas amostras e/ou

a quantidade destes compostos (flavonoides e fenóis) ainda estivessem em quantidade inferior à necessária para causar essa ação antibacteriana e fungicida. Nesse sentido, Castro, Cury e Rosalen (2007) notaram em seu estudo que umas das amostras de própolis estudada, apesar de revelar forte atividade antibacteriana, apresentou baixos teores de compostos fenólicos. Isso demonstra que a atividade antibacteriana pode realmente variar em função da sazonalidade, devido, provavelmente, a alteração da concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais destas própolis.

Outra questão importante a ser observada é que os patógenos testados também não foram sensíveis ao antibiótico cloranfenicol, utilizado como controle positivo. Esse fato sugere que as cepas testadas já apresentavam um grau de resistência elevado. O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas é incerta. Portanto, medidas devem ser tomadas para reduzir esse problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

Conclusões

Os resultados deste trabalho permitem inferir que todos os extratos de própolis comerciais analisados apresentaram características organolépticas, teor de flavonoides e fenóis totais em conformidade com a legislação vigente, proposta pelo Ministério da Agricultura. No entanto, para a atividade antioxidante, os valores encontrados (em segundos), nas três amostras, excederam os 22 segundos exigidos para que o extrato apresentasse tal atividade.

A caracterização fitoquímica preliminar de alguns compostos evidenciou a possível presença

de flavonoides e taninos condensados em todos os extratos.

Os extratos não inibiram o crescimento de nenhum dos patógenos testados. Dessa forma, maiores investigações quanto à resistência de bactérias à própolis e seus princípios antimicrobianos devem ser realizadas.

Referências

- ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE APICULTORES CRIADORES DE ABELHAS MELÍFERAS EUROPEIAS. Proposta de Regulamento de Identidade e Qualidade de extrato de Própolis. *Mensagem Doce*, Florianópolis, v. 52, p. 19-20, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. *Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001*. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbial Growth Control*. In: _____. *Biology microorganisms*. 9. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 2000. p. 770-779.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties antitoxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 36, p. 347-363, 1998.
- CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, p. 1512-1516, 2007.
- CRUZ, C. D. *Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística*. Viçosa: UFV, 2001.
- FUNARI, C. S.; FERRO, V. Análise de Própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, p. 171-178, 2006.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, Bucks, v. 60, p. 59-84, 1979.
- KORU, O.; TOKSOY, F.; ACIKEL, C. H.; TUNCA, Y. M.; BAYSALLAR, M.; USKUDAR GUCLU, A.; AKCA, E.; OZKOK TUYLU, A.; SORKUN, K.; TANYUKSEL, M.; SALIH, B. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, London, v. 13, p. 140-145, 2007.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da Própolis. *Química Nova*, São Paulo, v. 19, p. 29-36, 1996.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v. 74, p. 105-112, 2001.
- MATOS, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, p. 405-411, 2005.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 31, p. 247-256, 2000.
- ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FUNARI, S. R. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JÚNIOR, A. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, Botucatu, v. 11, p. 109-116, 2005.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; MASAHARU, F. F. A origem do conhecimento do homem sobre as virtudes alimentícias, curativas e profiláticas dos produtos das abelhas é bastante curiosa e interessante. *Revista OESP – Alimentação*, São Paulo, v. 27, p. 110-115, 1999.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; PIPPA, S. A. R.; LIMA, A. C. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 32, p. 997-1003, 2002.
- PARK, Y. P.; MASAHARU, I.; SILVA, J. A. A.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 18, p. 313-318, 1998.
- PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSSO, M. M. Efeito de extrato de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 38, p. 278-283, 2001.
- PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant

activity of soybeans and soy products. *Journal Food Science*, Chicago, v. 44, p. 1720-1722, 1979.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, New York, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; FUNARI, S. R. C.; BANKOVA, V. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, Botucatu, v. 7, p. 49-53, 2001.

SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; MARCUCCI, M. C.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, p. 1842-1848, 2006.

SOUZA, J. P. B.; NIEGE, A. J. C.; FURTADO, R. J.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 17, p. 85-93, 2007.

TORRES, C. R. G.; KUBO, C. H.; ANIDO, A. A.; RODRÍGUEZ, J. R. Antimicrobial agents and your potencial of use in odontology. *Revista da Faculdade de Odontologia*, Campinas, v. 3, p. 43-52, 2000.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato etanólico de própolis. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, p. 159-163, 2004.

Recebido em 27 de março de 2012
Aceito em 23 de julho de 2012

