

# ESTUDOS PRELIMINARES DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS

Eduardo Vicente<sup>a</sup>  
Elisa Yoko Hirooka<sup>b</sup>

## RESUMO

A atividade antimicrobiana de própolis foi estudada em *Streptococcus pyogenes*, microbiota de cavidade oral e fungos produtores de micotoxinas. Os meios CAM e BDA foram utilizados para o cultivo de fungos e o ágar Rogosa, APT, BHI e sangue para bactérias orais, empregando-se a combinação das técnicas de semeadura em profundidade e placa gradiente de Szibalsky. Os fungos toxigênicos não foram inibidos pela própolis. A própolis apresentou efeito bacteriostático em microrganismos da cavidade oral semeados em profundidade na placa gradiente, observando-se crescimento inclusive com 1,0% de própolis após 72 horas. Em *S. pyogenes*, apenas a produção de hemolisina foi inibida em ágar sangue, porém observou-se efeito bactericida em caldo BHI + própolis. A atividade de própolis em *S. pyogenes* dependeu da aeração e tipo de nutrientes e provavelmente além de ação antimicrobiana, as propriedades farmaco-dinâmicas determinam o efeito final do sistema biológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Própolis; *Streptococcus pyogenes*; Bactericida; Bacteriostático.

## 1 - INTRODUÇÃO

Própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas (*Apis mellifera* L.) e utilizada na medicina popular devido a propriedade farmaco-dinâmica e antimicrobiana (AZEVEDO & FLECHTMANN, 1983; TREVISAN, 1983; MERESTA & MERESTA, 1985). Esta substância é composta de 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen, sendo identificados ácidos aromáticos insaturados e flavonóides entre substâncias com atividade biológica (IORICH, 1981, apud TREVISAN, 1983), mostra microelementos (DIMITROV-MANGADIEV, 1976) e apesar da constatação de atividade enzimática de interesse, estas estão entre componentes pouco estudados (POPESCU et alii, 1976).

A atividade bactericida de própolis foi descrita por KIVALINA em 1959 (apud AZEVEDO & FLECHTMANN, 1963), que posteriormente também observou efeito bacteriostático de amplo espectro, cuja intensidade variou de acordo com a procedência (KIVALINA, 1976). Entre outras propriedades estão o efeito cicatrizante, anestésico e anti-inflamatório (DONADIEU, 1980, apud TREVISAN, 1983), porém constatou-se atividade mitogênica depressiva em meristemas de *Allium cepa* (POPOVICI, 1976) e manifestações cutâneas alérgicas em apicultores (TREVISAN, 1983).

Tendo em vista que a própolis tem sido utilizada em escala comercial na homeopatia, o presente trabalho propõe

estudar atividade antimicrobiana desta substância em microrganismos da cavidade oral, dando maior ênfase a *Streptococcus pyogenes*, assim como avaliar a viabilidade da utilização deste composto na preservação de alimentos com baixa umidade, visando a inibição de fungos toxigênicos.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### Solução de própolis "in natura"

A solução de própolis a 10,0% foi preparada com amostra proveniente de Rio Claro-SP em etanol absoluto, obtendo-se um líquido límpido de coloração amarelada após a filtração do macerado a -20°C para eliminação de ceras. A solução aquosa a 20,0% foi obtida adicionando-se 10,0 mL de H<sub>2</sub>O a 20,0 ml de solução alcoólica a 10,0% e a mistura mantida a 50°C em banho de água, até a redução para volume final de 10,0 ml, considerando a termoestabilidade de própolis e eliminação do etanol por evaporação (PRADO FILHO et alii, 1962).

### Teste de solubilidade de própolis

A solubilidade de própolis foi analisada em H<sub>2</sub>O, HCL 1,0N, NaOH 1,0N, etanol, etanol + H<sub>2</sub>O (1:2), Tween 20 e 80, n-hexano e clorofórmio.

### Efeito de própolis em fungos toxigênicos

Solução aquosa de esporos em 0,1% de Tween 80 foi preparada com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999

Recebido em 09/11/87

<sup>a</sup> Estagiário da disciplina de Microbiologia, Departamento de Patologia Geral - CCB/UEL

<sup>b</sup> Departamento de Patologia Geral - CCB/UEL



NRRL 5520 (AFB<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>), *A. flavus* NRRL 3251 (AFB<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>), *A. ochraceus* NRRL 3174 (ocratoxina A e 4-hidroxi-meteína), *A. melleus* NRRL 3519 (ocratoxina A), *Penicillium roquefort* HPB 110376-8 (Patulina) e *Penicillium citrinum* AVA 533 (citrinina).

A seguir a suspensão foi semeada em estrias em ágar bata-ta dextrosado (BDA) contendo 0,1 a 1,0% de própolis, se-gundo a técnica de placa gradiente de Szibalski (BRAUDE, 1980).

A atividade de própolis "in natura" foi avaliada em ágar (BDA) e ágar coco (CAM), semeando-se esporos no centro e colocando-se fragmentos de própolis ou 0,1ml de solução alcoólica a 10,0%, respectivamente, em lados opo-stos da placa. As placas foram incubadas a 25°C e observa-das durante 6 dias.

#### Efeito de própolis em microbiota da cavidade oral

A placa gradiente foi preparada com ágar "all purpose medium with tween" (APT) e Rogosa contendo 0,1 a 1,0% de própolis em solução alcoólica e 1,0ml de etanol como controle. O inóculo consistiu de 0,1ml de saliva em 50,0ml dos respectivos meios de cultura mantidos a 50°C e pla-queados sobre a base inclinada contendo própolis. As pla-cas foram incubadas a 37°C e observadas durante 4 dias.

#### Efeito de própolis em estreptococos $\alpha$ e $\beta$ hemolíticos - crescimento em ágar sangue

A atividade antimicrobiana de própolis foi testada pela técnica de BAUER et alii (1966), umedecendo os discos de papel de filtro com 5,0  $\mu$ l de solução alcoólica de pró-polis a 10,0% e secos a 37°C.

A inibição de atividade hemolítica em *S. pyogenes* foi testada cobrindo-se metade da superfície de ágar sangue com 0,1ml de solução aquosa de própolis a 20,0% e semea-das em estrias com a cultura de estreptococos.

#### - crescimento em meio líquido

Quatro séries de 6 tubos 18 x 180mm contendo 40,0 ml de caldo BHI, caldo base para ágar sangue (CB) adicio-nado de 0,4% e 0,7% de NaCl foram preparadas e 3 tubos de cada série, adicionados de 8,0% de sangue desfibrinado de carneiro. Duas séries foram adicionada de 30 $\mu$ l de so-lução aquosa de própolis a 20,0% e incubadas a 37°C por 20 horas em cultura mantida sem agitação ou sob agitação a 70 rpm em banho de água da Etica, com os respectivos controles sem própolis. A confirmação do crescimento foi realizada semeando-se todos os tubos em ágar sangue.

O esquema da experiência está apresentado na figura 1.

### 3 - RESULTADOS

A própolis "in natura" solubilizou-se facilmente em eta-nol, clorofórmio e NaOH 1,0N, porém insolúvel em H<sub>2</sub>O e HCl 1,0N.

O extrato alcoólico de própolis em concentração de 0,1 a 1,0% não inibiu nenhuma das linhagens de fungos micoto-xigênicos testados (tabela 1).

Tabela 1 — Teste da Atividade Antimicrobiana de Própolis em Fungos Toxigênicos

| Concentração ** de Própolis | Leituras |        |        |
|-----------------------------|----------|--------|--------|
|                             | 3º dia   | 4º dia | 5º dia |
| 1.0%                        | +        | ++     | +++    |
| 0.5%                        | +        | ++     | +++    |
| 0.2%                        | +        | ++     | +++    |
| 0.1%                        | +        | ++     | +++    |

\* Incubação a 25°C

\*\*g/% de própolis

Variação do Número de Colônias: de — até +++

Quanto a microbiota da cavidade oral, apresentada na tabela 2, as concentrações de própolis em placa gradiente inibiu gradativamente o crescimento microbiano semeado pela técnica de pourplate, e o ágar APT permitiu o desen-volvimento de maior número de colônias. A concentração de 0,5 e 1,0% de própolis inibiu o crescimento da microbio-ta oral apenas até o 2º dia, cessando o seu efeito inibitório após 72 horas nas concentrações baixas. A adição de etanol em placa controle sem própolis não interferiu no crescimen-to de microrganismos da cavidade oral.

Tabela 2 — Análise da Atividade Antimicrobiana de Própolis em microbiota oral

| Concentração de própolis | Ágar APT |     |        |     |        |     | Ágar Rogosa |    |        |    |        |     |
|--------------------------|----------|-----|--------|-----|--------|-----|-------------|----|--------|----|--------|-----|
|                          | 1º dia   |     | 2º dia |     | 3º dia |     | 1º dia      |    | 2º dia |    | 3º dia |     |
|                          | M        | W   | M      | W   | M      | W   | M           | W  | M      | W  | M      | W   |
| 1.0%                     | —        | —   | —      | —   | +      | ++  | —           | —  | —      | —  | +      | ++  |
| 0.5%                     | —        | —   | —      | —   | +      | ++  | —           | —  | —      | —  | +      | ++  |
| 0.2%                     | +        | +   | +      | +   | ++     | +++ | —           | +  | +      | +  | +      | ++  |
| 0.1%                     | +        | ++  | +      | ++  | +++    | +++ | +           | +  | +      | +  | ++     | +++ |
| C/E                      | +++      | +++ | +++    | +++ | +++    | +++ | ++          | ++ | ++     | ++ | ++     | +++ |
| C                        | +++      | +++ | +++    | +++ | +++    | +++ | ++          | ++ | ++     | ++ | ++     | +++ |

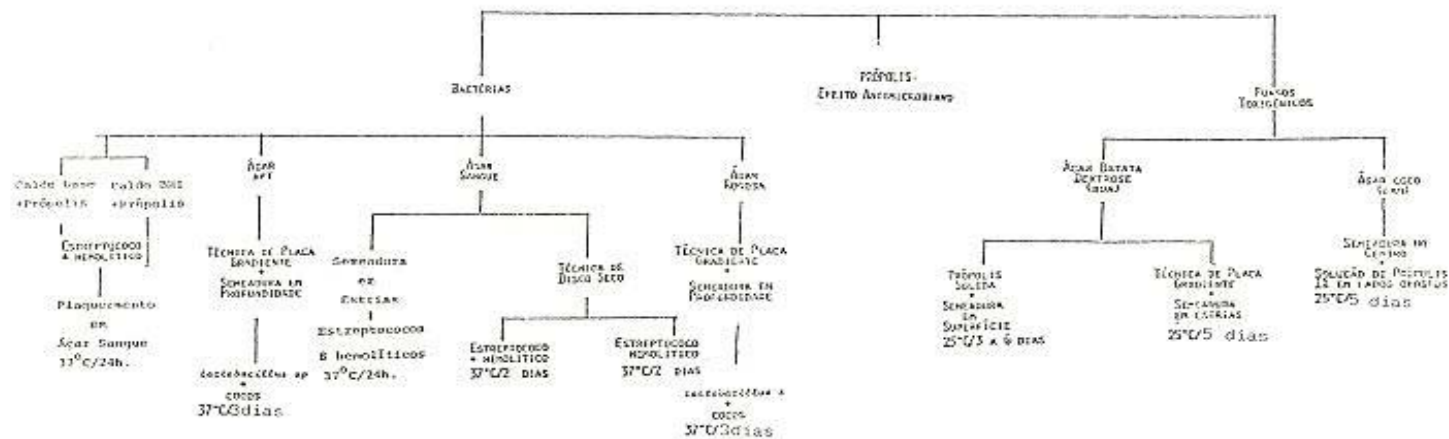
C/E — Controle em Etanol

C — Controle

M — Maior Concentração de Própolis

W — Menor concentração de Própolis

Varição do Número de Colônias: de — a +++





A tabela 3 analisa o efeito de própolis em estreptococos  $\beta$ -hemolíticos identificados como *S. pyogenes*  $\alpha$ -hemolíticos isolados da cavidade oral, pela técnica de semeadura em superfície.

Os estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos não foram inibidos pela própolis, enquanto que nos  $\beta$ -hemolíticos ocorreu halo não hemolítico em torno de discos contendo a substância. Entretanto a inibição ocorreu somente a nível de produção de hemolisina, quando semeados em placas com a metade da superfície coberta com própolis. Estas linhagens retornaram a produzir hemolisina em ágar sangue sem própolis.

Tabela 3 - Efeito da atividade antimicrobiana de própolis no crescimento de estreptococos  $\alpha$  e  $\beta$  hemolíticos em ágar sangue.

| MICROORGANISMO  | ÁGAR SANGUE           |                 |                   |                                 |              |
|---|-----------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------|--------------|
|   | Técnica de Disco Seco |                 |                   | Técnica de Semeadura em Estrias |              |
|   | PB <sup>a</sup>       | PF <sup>b</sup> | ETOH <sup>c</sup> | COM PRÓPOLIS                    | SEM PRÓPOLIS |
| Estreptococos - crescimento $\alpha$ -Hemolíticos - Hemólise                        | +                     | +               | +                 | NA <sup>d</sup>                 | NA           |
| Estreptococos - crescimento $\beta$ Hemolíticos - Hemólise ( <i>Str. pyogenes</i> ) | +                     | +               | +                 | +                               | +            |

a - PB - Solução alcoólica de própolis bruto.  
b - PF - Solução alcoólica de própolis filtrada.  
c - ETOH - Etanol p.a.  
d - NA - não analisado

A tabela 4 analisa o efeito da aeração em tubos contendo diferentes meios líquidos e confirmando o crescimento em ágar sangue. O estreptococo  $\beta$ -hemolítico cresceu em todos os tubos sem própolis, porém na presença deste composto, não se desenvolveu em meios sem sangue na comparação de BHI + SG e CB + 0,7% NaCl + SG em cultura estacionária ou com agitação a 70 rpm, verificamos maior hemólise em cultura mantida sem agitação.

Tabela 4 - Efeito da atividade antimicrobiana de própolis no crescimento de *Str. pyogenes* em meios líquidos.

| MEIOS DE CULTURA            | Cultura Estacionária |                       |              |          | Agitação a 70 RPM |          |              |          |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|--------------|----------|-------------------|----------|--------------|----------|
|                             | Sem Própolis         |                       | Com Própolis |          | Sem Própolis      |          | Com Própolis |          |
|                             | Caldo                | Placa AS <sup>a</sup> | Caldo        | Placa AS | Caldo             | Placa AS | Caldo        | Placa AS |
| CB <sup>b</sup> + 0,4% NaCl | +                    | +                     | -            | -        | +                 | +        | -            | -        |
| CB + 0,7% NaCl              | +                    | +                     | -            | -        | +                 | +        | -            | -        |
| SG <sup>c</sup> + BHI       | H <sup>f</sup>       | +                     | H            | +        | +                 | +        | H(<)         | +        |
| SG + CB + 0,4% NaCl         | H                    | +                     | H            | +        | H                 | +        | H            | +        |
| SG + CB + 0,7% NaCl         | H                    | +                     | H            | +        | H                 | +        | H(<)         | +        |

a - AS - ágar sangue  
b - BHI - caldo infuso de coração e cérebro  
c - CB - caldo base para ágar sangue  
d - (+) - pouco crescimento ou pouca hemólise  
e - SG - sangue  
f - H - hemólise

#### 4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A melhor solubilização de própolis em solventes orgânicos moderadamente polares em relação a água, indica que esta substância contém componentes ativos de polaridade média.

Como foi demonstrado na tabela 1, própolis não apresentou nenhuma inibição sobre os fungos toxigênicos, tendo verificado que *P. citrinum* cresceu também sobre própolis "in natura" e quando cultivado em ágar-coco, tampouco ocorreu interferência na fluorescência devido a produção de micotoxinas.

Embora seja citado o efeito antifúngico de própolis em recomendações oficiais, os nossos resultados evidenciaram nenhuma proteção contra fungos toxigênicos testados. Resultados semelhantes tem sido descritos por IALOMITEANU (1976) que constatou resistência de *A. niger*, *A. flavus*

e *Penicillium* sp a 0,01 a 0,1 g% de própolis, não ocorrendo o mesmo com *Cladosporium* sp.

Segundo DEREVICI (1976), própolis não inibiu o crescimento de *A. niger* e *Mucor mucedo* inoculados em abelhas.

Quanto a microbiota oral (tabela 2), própolis demonstrou ação bacteriostática de pouca duração, já que no decorrer da experiência observou-se desenvolvimento gradativo das colônias. Aparentemente, o efeito inibitório inicial ocorreu exclusivamente devido a própolis e a adição de quantidade equivalente de etanol não afetou o crescimento microbiano, devido à evaporação do etanol durante o preparo do meio, mantido a 50°C, descartando o efeito adicional do etanol descrito por GRECEANU & ENCIU (1976). O efeito antibacteriano foi observado em várias espécies de *Bacillus*, *S. aureus*, *Salmonella* (PRADO FILHO & AZEVEDO, 1962; AZEVEDO & FLECHTMANN, 1963) e MERESTA & MERESTA (1985) discute a aplicação de própolis no tratamento de mastite bovina.

Analisando os estreptococos isolados da cavidade oral em ágar sangue, própolis inibiu apenas a produção de hemolisina por *S. pyogenes* (tabela 3) e nenhum efeito inibitório foi observado em estreptococos - hemolíticos tanto no crescimento como em hemólise indicando pouca interferência desta substância na microbiota oral, quando utilizada como antisséptico bucal.

Entretanto, devemos levar a essa consideração, propriedade altamente aderente de própolis em água que poderia alterar a absorção de nutrientes ou liberação de enzimas hidrolíticas no trato gastrointestinal.

Em função da composição do meio e aeração, própolis apresentou efeito bacteriostático, bactericida ou indiferente (tabelas 3 e 4) e este fato explicaria em parte, a observação feita por KIVALINA (1959 apud AZEVEDO & FLECHTMANN, 1863; 1976), onde foi observada diferença em ação antibacteriana de própolis.

Assim, em caldo sem adição de sangue, própolis apresentou efeito bactericida, diferindo dos resultados da tabela 2, onde observou efeito bacteriostático.

A maior hemólise observada em caldo com sangue em cultura estacionária (tabela 4) sugere que própolis bloqueia a produção, liberação e/ou atuação de estreptolisina S, já que não ocorreu hemólise em placa de ágar sangue contendo própolis (tabela 3).

A maior atividade hemolítica indiretamente significa maior crescimento e estaria de acordo com a literatura; os estreptococos apresentam metabolismo fermentativo e sendo catalase negativa (SCLEIFER, 1986), a baixa aeração favoreceria o crescimento devido a ausência de produtos reativos oriundos do metabolismo oxidativo (BEAMAN & BEAMAN, 1984).

Por outro lado, segundo POPESCU et alii (1976), própolis contém transidrogenase anaeróbica que catalisa a transferência de H<sup>+</sup> de NADPH para NAD<sup>+</sup> (LEHNINGER, 1984), modificando os níveis energéticos celulares e consequentemente acelera a recuperação do paciente. Sendo assim, em baixa tensão de oxigênio, as hemácias deveriam estar mais protegidas; resultado inverso de nossos resultados (tabela 4).

Talvez, isto se deva ao fato de que, estando em cultura estacionária, a transidrogenase anaeróbica atuaria diminuindo níveis de NADPH, essencial para a estabilidade da membrana (LEHNINGER, 1984), facilitando a intercalação da hemolisina na camada fosfolipídica, como foi demonstrado



por IKIGAI & NAKAE (1987 e b).

Esta situação provavelmente não ocorre in vivo, já que atividade biológica mantém reposição e nutrição constante das células.

Além disto, observamos que apesar da pequena ação antimicrobiana de própolis, este efeito é complementado com atividades farmaco-dinâmicas e enzimáticas, resultando em propriedades terapêuticas.

#### ABSTRACT

Antimicrobial activity of propolis was studied in *Streptococcus pyogenes*, oral microflora and micotoxic fungi. CAM and PDA medium were used for fungal study and Rogosa, APT, BHI and blood for oral bacteria, using the combination of pour-plate and Szibalsky gradient plate technique. The toxic fungi were not inhibited by propolis. Propolis showed bacteriostatic action on the oral microflora inoculated by pour plate technique in gradient plate, but the growth occurred also with 1,0% propolis after 72 hours incubation. Concerning *S. pyogenes*, only haemolysin production was inhibited on blood agar, but bactericidal action was seen when inoculated in BHI + propolis broth. Effect of propolis on *S. pyogenes* depended on aeration and nutrient composition, and probably both antimicrobial and pharmac-dinamical propriety are important for the final effect on biological system.

**KEY WORDS:** Propolis; *Streptococcus pyogenes*; Bactericidal; Bacteriostatic.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZEVEDO, J.L. & FLECHTMANN, C.H.W. Ocorrência de substâncias antimicrobianas em produtos de alguns insetos sociais. *Rev. Agricult.*, 38(3):129-36, Piracicaba, 1963.
2. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.G.; TURK, M. Antibiotic susceptibility by standardized single disc method. *Amer. J. Clin. Path.*, 45:493-96, 1986.
3. BEAMAN, L. & BEAMAN, B. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense. *Ann. Rev. Microbiol.*, 38:24-48, 1984.
4. BRAUDE, A.I. Microbial susceptibility to drugs. In: *Medical Microbiology and infectious diseases*. Philadelphia, Saunders Company, 1980. p. 210-34
5. DEREVICI, A. Contribuciones al estudio del propóleos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 237-56.
6. DIMITROV-MANGADIEV, N. Dados espectrales acerca de la composición mineral del propóleos del Bulgaria. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 162.
7. GRECEANU, A. & ENCIU, V. Algunas observaciones acerca del efecto antibiótico del propóleos, polen y miel. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 182-5.
8. IALOMITEANU, M. et alii. Perspectives del empleo terapeutico del propóleos en afecciones causadas por flagelados y leveduras. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 157-8.
9. IKIGAI, H. & NAKAE, T. Assembly of the toxin-hexamer of *S. aureus* in the liposome membrane. *J. Biol. Chem.*, 262(5):2156-60, 1987a.
10. \_\_\_\_\_. Interaction of the toxin of *S. aureus* with the liposome membrane. *J. Biol. Chem.*, 262(5):2150-6, 1987b.
11. KIVALINKINA, V.P. Balance y perspectivas de la investigación del propóleos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 204.
12. LEHNINGER, A.I. Electron transport, oxydative phosphorylation, and regulation of ATP production. In: *Principles of biochemistry*. New York, Worth Publishers, 1982. pt. 2, chp. 17.
13. MERESTA, L. & MERESTA, T. An attempt to use the extract from propolis in the treatment of mastitis of cows. *Med. Veter.*, 41(8):489-92, 1985.
14. MITSUHASHI, S. Resistance to antimicrobial drugs. In: BRAUDE, A.I. *Medical microbiology and infectious diseases*. Philadelphia, Saunders Company, 1980. p. 247-55. New York, North Publ. Shers, 1982.
15. PALOS, E. et alii. Tecnologia de preparación del extracto blando de propóleos de uso farmacéutico. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 163-6.
16. POPESCU, V. et alii. Determinacion de la actividad de las transhidrogenasas-anaerobicas y las sustancias generadoras de hidrógeno del propóleos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA, 2. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 209-13.
17. POPOVICI, N. & OITA, N. Influencia de los extractos de propóleos en la mitosis en meristemas de *Allium cepa* L. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE APITERAPIA. *Nuevas investigaciones en la apiterapia*. Bucarest, Ed. Apimondia, 1976. p. 373-5.
18. PRADO FILHO, L.G. et alii. Antimicrobianos em própolis de *Apis mellifera* L. *Bol. Ind. Anim.*, 20:399-401, 1963.
19. SHLEIFER, K.H. Gram-positive cocci. In: SNEAT, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins 1986. 2v. p. 999-1100.
20. TREVISAN, M.D.P. Própolis. *Inf. Agropec.*, Belo Horizonte, 9(106):50-2, 1983.