

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

NARA PATRÍCIA CAVALCANTI ANDRADE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS SOBRE CEPAS DE
Aeromonas spp. ISOLADAS DE PEIXES**

Petrolina – PE

2010

NARA PATRÍCIA CAVALCANTI ANDRADE

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS SOBRE CEPAS DE
Aeromonas spp. ISOLADAS DE PEIXES**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, para obtenção do grau de Mestre, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Márcia de Fátima Ribeiro

Co-orientador: Prof^º. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Petrolina – PE

2010

A553a Andrade, Nara Patrícia Cavalcanti
Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis sobre cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes / Nara Patrícia Cavalcanti Andrade. – Petrolina, 2010.
59f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, PE.
Orientadora: Dra. Márcia de Fátima Ribeiro

Bibliografia

1. Aquicultura. 2. Própolis – Atividade Antimicrobiana – Peixes. 3. Curva de Sobrevivência. I. Título. II Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 639.8

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca
SIBI/UNIVASF

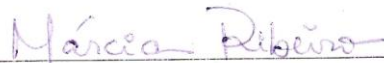
Bibliotecário: Lucídio Lopes de Alencar

NARA PATRÍCIA CAVALCANTI ANDRADE

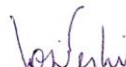
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS SOBRE CEPAS DE
Aeromonas spp. ISOLADAS DE PEIXES**

Comissão Julgadora

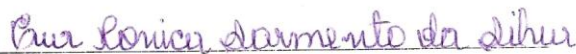
Dissertação para obtenção do grau de Mestre



Prof.^a Dr.^a Márcia de Fátima Ribeiro
Orientadora (EMBRAPA SEMI-ÁRIDO)



Dr.^a Josir Daine Aparecida Veschi
(EMBRAPA SEMI-ÁRIDO)



Prof.^a Dr.^a Eva Mônica Sarmiento da Silva
Departamento de Zootecnia (UNIVASF)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em 16/04/2010.

Dedicatória

Dedico a Gabriel Cavalcanti Alves (meu filho).

Agradecimentos

OBRIGADA SENHOR, pai misericordioso, de infinita bondade e amor, pela minha existência, por sempre me guiar em meus propósitos, me dar conforto em meus desesperos e força para estudar, trabalhar e criar meu filho. Tudo, é o que te agradeço senhor.

Ao meu Prof^o Mateus Matiuzzi da Costa pela força, paciência por sempre querer me ensinar mais e mais, pelo carinho e dedicação e por estar sempre apostos para me ajudar.

À prof^a Dra. Márcia de Fátima Ribeiro, minha Orientadora, aos Professores: Adriana Mayumi Yano de Melo, Cristina Krewer, Arthur Mascioli, Fábio Meurer, Flaviane Monteiro, Carlos Aragão e Eva Mônica, que me auxiliaram nas aulas do mestrado.

Aos meus avós, João Domiciano e M^a Alzira, que, com todo esforço, pulso, carinho e dedicação, me criaram, me ensinando a diferença do certo e do errado, ao meu filho que me dá a força e a vontade de viver e crescer junto com ele. À minha mãe, M^a da Saúde e meu irmão Nadson, pelo apoio.

Aos espíritos benfeitores que sempre estão comigo nas horas mais difíceis.

À Ceíça, pelas palavras de incentivo, ajuda e dedicação nos trabalhos laboratoriais. Foi através dela que tudo começou.

A toda família do laboratório de Microbiologia e Imunologia do campus Ciências Agrárias - UNIVASF, Rodolfo, Mariely, Daline, Jorge, Denise, Manoel, Messias, Luciana, Isabela, Márcia, Eliene, Lurdinha e Jarbas pelo estudo, experiências e pelas conversas e brincadeiras nas horas vagas.

À Associação dos Criadores de Abelha do Município de Petrolina (ASCAMP) pela doação da própolis bruta PE.

À Cláudia Barreto por ceder as própolis bruta dos estados de MG e CE.

Às minhas irmãs de coração, Liliane, Valquíria, Sara e Margarida.

À Orieta pelas palavras confortáveis faladas por ela e ditadas por DEUS.

Ao nego pela ajuda braçal na preparação das placas e preocupação do meu bem estar.

À Secretaria Municipal de Educação de Petrolina, por ceder 50% de minha carga horária.

Também agradeço aos funcionários da UNIVASF – campus Ciências Agrárias, pelo constante apoio nas atividades de campo e de laboratório, principalmente aos seguranças noturnos, de quando eu ia trabalhar à noite.

MUITO OBRIGADA!

“Depois de algum tempo você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se levam anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas num instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Descobre que as pessoas com as quais você mais se importa são tomadas de ti muito depressa, por isso devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pois pode ser a última vez que a vemos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas sim com o melhor que pode ser. Descobre que leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser e que o tempo é curto.

Aprende que paciência requer muita prática. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiências que viveu do que quantos aniversários celebrou. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel... Aprende que, com a mesma severidade com que julga, será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços o seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o concerte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. E aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte! E que pode ir muito mais longe depois de pensar que não pode ir mais... e que realmente a nossa vida tem valor e que você tem valor diante da vida! As nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar”.

William Shakespeare

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Introdução	15
Referências	17
Capítulo 1 – Própolis, uma alternativa na terapia antimicrobiana	20
Resumo.....	21
Abstract.....	22
1. Introdução.....	23
2. Origem, composição e classificação da própolis.....	23
3. Atividade antimicrobiana da própolis.....	26
4. Estudos <i>in vivo</i> da atividade da própolis em animais.....	30
5. Estudos da atividade imunomodulatória.....	31
6. Conclusões.....	33
7. Perspectivas.....	34
8. Referências bibliográficas.....	35
Capítulo 2 – Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre cepas de <i>Aeromonas</i> spp. isoladas de peixes	40
Abstract.....	41
Resumo.....	42
1. Introdução.....	43
2. Material e Métodos.....	45
2.1 Local	45
2.2 Preparo do extrato de própolis.....	45
2.3 Teste da Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	45
2.4 Curva de sobrevivência.....	46
2.5 Análise estatística	47
3. Resultados.....	47
3.1 Concentração Bactericida Mínima dos diferentes extratos de própolis	47
3.2 Curva de sobrevivência bacteriana frente aos extratos de própolis.....	48
4. Discussão.....	49
5. Conclusões.....	52
6. Agradecimentos.....	53
7. Referências bibliográficas.....	53
Conclusões gerais	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
CAPE	Éster Fenil do Ácido Caféico
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EN	Exterminadoras Naturais
g	Gramma
h	Hora
Kg	Kilograma
l	Litro
MH	Muller Hinton
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
PCA	Ágar Padrão de Contagem
PMCE	Própolis Marrom do estado do Ceará
PMPE	Própolis Marrom do estado de Pernambuco
PV	Própolis Verde do estado de Minas Gerais
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Pág.
Tabela 1. Concentração Bactericida Mínima dos extratos de própolis frente aos isolados de <i>Aeromonas</i> spp.	48

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2	Pág.
Figura 1. Curva de sobrevivência dos isolados de <i>Aeromonas</i> spp. frente aos extratos etanólicos das própolis.....	49

RESUMO

A própolis é um produto natural elaborado por abelhas da espécie *Apis mellifera*, e devido à sua atividade antimicrobiana, tem sido usada frequentemente na medicina alternativa em diversos locais do mundo. O objetivo deste estudo foi revisar a atividade antimicrobianas da própolis e testar essa atividade usando três tipos de própolis frente a 15 isolados de *Aeromonas* spp. Foram utilizadas própolis marrom e verde, obtidas nos estados de Minas Gerais (MG), Ceará (CE) e Pernambuco (PE). Os extratos etanólicos das própolis foram preparados a 70%, de acordo com instruções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os isolados foi realizada em triplicata. Diluições de álcool etílico a 70% foram utilizadas como controle. Foi encontrada sensibilidade em todos os isolados testados na CBM. A própolis verde de MG apresentou média na CBM de 1,68%, enquanto que para as marrons do CE e de PE as médias foram 2,31% e 3,75%, respectivamente. Para determinação da curva de sobrevivência, os diferentes extratos a 15% foram incubados com os isolados e levados à estufa a 27°C. Após 3, 12 e 24 horas foram plaqueados em Ágar Padrão de Contagem (PCA), em duplicata. Após 24 horas de incubação as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram contadas. Entretanto, na curva de sobrevivência, após 3 horas de incubação, houve multiplicação bacteriana, o que diferiu dos resultados obtidos na CBM. O padrão de crescimento de *Aeromonas* spp. pode estar associado ao efeito bacteriostático da própolis. O extrato de própolis verde apresentou resultados estatisticamente significativos em comparação com o extrato de própolis marrom.

Palavras-chave: apicultura, aquicultura, atividade antimicrobiana, curva de sobrevivência.

ABSTRACT

Propolis is a natural product elaborated by *Apis mellifera* bees and due to its antimicrobial activity it has been used frequently in alternative medicine in many places of the world. The objective of this study was to review the antimicrobial activity of propolis and to test this activity in three kinds of propolis against 15 isolates of *Aeromonas* spp.. Brown and green propolis were used and they were obtained from the states of Minas Gerais (MG), Ceará (CE) and Pernambuco (PE). The propolis ethanolic extracts were prepared at 70%, following The Ministry of Agriculture, Pecuary and Provisioning guidelines. The determination of the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) for the isolates was realized in triplicate. Alcohol ethylic dillutions at 70% were used as control. It was found sensibility in all tested isolates in the MBC. The average MBC for green propolis of MG was 1.68%, while for the brown propolis from CE and PE, the averages were 2.31% and 3.75%, respectively. Ethanol dilutions at 70% were used as control. In order to determine the survival curve, the different extracts at 15% were incubated with the isolates and taken to the incubator at 27°C. After 3, 12 and 24hs, they were placed into plates with Plate Count Agar (PCA), in duplicate. After 24hs of incubation the Colony Forming Units (CFU) were counted. However, in the survival curve, after 3 hours of incubation, there was bacterial growth differing from the results obtained at the MBC. The growth pattern of *Aeromonas* spp. can be associated to bacteriostatic effect of propolis. The extract of green propolis presented results statistically significant in comparison to the extract of the brown propolis.

Key words: apiculture, aquaculture, antimicrobial activity, survival curve.

INTRODUÇÃO

A prática da medicina natural e alternativa tem despertado interesse cada vez maior sobre os produtos apícolas, representando uma importante fonte de renda para a apicultura nacional. Devido as suas propriedades terapêuticas, a própolis vem sendo utilizada na medicina humana e veterinária desde a antiguidade (PARK et al., 1998; KUJUMGIEV et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000; SFORCIN et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001; ITO et al., 2001). Nos últimos anos, o comércio da própolis aumentou intensamente, sendo esta requerida principalmente pela indústria farmacêutica (ORSI e FUNARI, 2005), destacando-se os extratos hidroetanólicos.

As universidades, juntamente com as principais indústrias farmacêuticas, têm concentrado esforços em isolar e identificar novos compostos com propriedades antimicrobianas, como uma emergência da resposta à resistência bacteriana (TAYLOR et al., 2002). Os produtos naturais são fontes valiosas para o desenvolvimento de novos compostos medicinais (NEWMAN et al., 2000). Os flavonóides provenientes de produtos naturais, originais ou com suas estruturas alteradas, são uma das principais classes de compostos que podem ser utilizados como agentes terapêuticos (CUSHINE e LAMB, 2005). Estes compostos permitem a descoberta de agentes naturais para tratar imunodeficiências, doenças infecciosas, câncer entre outras (CLARDY e WALSH, 2004). Segundo PEREIRA et al. (2002) os flavonóides, dentre outros, constituem a própolis.

No Brasil, diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos com a utilização da própolis, onde a mesma já foi classificada em 13 grupos. Doze destes foram descritos por ALENCAR (2002), sendo cinco grupos do Sul, um do Sudeste e seis do Nordeste. O 13º grupo foi descrito por DAUGSCH et al., (2006), também do Nordeste do Brasil. RIGHI (2008) pesquisou os possíveis 14º e 15º grupos em seu estudo sobre o perfil químico de amostras de própolis brasileiras.

O seu efeito para determinados microrganismos tem se revelado altamente inibitório, como o descrito para *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Mycobacterium* spp.. Entretanto, é parcialmente efetivo ou inativo em relação a grupos de bactérias gram negativas como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. (PRADO FILHO et al., 1962; GRANGE e DAVEY, 1990; DETOMA e OZINO, 1991; MAZZUCO et al., 1996).

As bactérias do gênero *Aeromonas* são consideradas patogênicas para várias espécies aquáticas e terrestres (SAAVEDRA et al., 2004). *A. hydrophila* é causadora de sérias epidemias de enfermidade ulcerativa em muitos criatórios de peixe ao redor do mundo (LEWIS & PLUMB, 1979). Apatia, perda de apetite e de equilíbrio, mudanças no comportamento, lesões epidérmicas com despigmentação, necrose da pele e úlceras com exposição da musculatura são geralmente observadas em infecções por *A. hydrophila* (PLUMB, 1994). LEMOS et al. (2006), estudando os possíveis ectoparasitas e bactérias em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em pisciculturas intensivas na região de Paulo Afonso/BA, encontraram *A. hydrophila* e confirmaram a necessidade de avaliações das condições de manejo do cultivo, para assim avaliar a necessidade de antibióticos.

O uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, tanto para a terapia de doenças, como para promoção de crescimento, aumenta a pressão da seleção sobre os microrganismos levando à resistência bacteriana. Além da seleção das bactérias resistentes após a morte daquelas sensíveis ao antimicrobiano, há também a possibilidade da transferência dos genes de resistência à outras nunca antes expostas (VERSCHUERE et al., 2000). Segundo FRANCO et al., (2007) vários estudos têm sido realizados para desenvolver novos aditivos visando substituir os antimicrobianos promotores de crescimento. Assim, o uso de antimicrobianos de origem natural pode tornar-se uma alternativa eficaz e econômica (CRISAN et al., 1995) e a própolis, por ser um antimicrobiano natural, pode substituir o uso dos beta lactâmicos (GARCIA et al., 2004). Segundo SAAVEDRA et al. (2004) é crescente a resistência de *Aeromonas* spp. aos antimicrobianos sintéticos na aquicultura.

Neste sentido, é de fundamental importância o estudo da atividade antimicrobiana das diferentes própolis brasileiras em bactérias patogênicas de peixes. Após a padronização da própolis os aquicultores poderão substituir o uso de antimicrobianos sintéticos em sistemas intensivos por estes produtos naturais, alcançando melhores resultados, e sem prejudicar o meio ambiente. Além disso, faz-se necessária a continuidade dos estudos acerca dos tipos de própolis como alternativa terapêutica para melhoria do desenvolvimento e controle de sobrevivência de peixes.

O objetivo deste trabalho foi revisar os tipos de própolis já classificados, algumas de suas atividades farmacêuticas e pesquisar a sensibilidade e curva de sobrevivência de isolados de *Aeromonas* spp. frente a amostras de própolis de três estados brasileiros.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 72, n. 1-2, p. 239 – 246, 2000.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432, p. 829-837, 2004.
- CRISAN, I.; ZAHARIA, C.N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCALU, C.; MUTIU, A.; PETRESCU, A. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romanian Journal of Virology**, Bucureste, v. 46, n. 3-4, p. 115-133, 1995.
- CUSHINE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 343-356, 2005.
- DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I.B.; ABREU J.Á.; PARK, Y.K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. Mensagem Doce, 2006, n. 89. Disponível na Internet: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>, capturado em Janeiro de 2010.
- DETOMA, P.; OZINO, O.I. Azione della propoli su microorganismi dell'ambiente ospedaliero. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 41, p. 231-236, 1991.
- FRANCO, S. S.; ROSA, A.P.; LENGELER, S.; UTTPATEL, R.; ZANELLA, I.; GRESSLER, C.; SOUZA, H. M. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. **Ciência Rural**. v. 37, n. 6, p. 1765-1771, 2007.
- GARCIA, R.C.; SÁ, M.E.P.; LANGONI, H.; FUNARI, S.R.C. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 57- 67, 2004.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.
- ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new mellifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal Natural Products**, v. 64, p. 1278-1281, 2001.

- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 64, p. 235-240, 1999.
- LEMOS, J.B.; RODRIGUES, M.E.B.; LOPES, J.P. Diagnóstico de ectoparasitas e bactérias em tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas na região de Paulo Afonso-BA **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v.1, n. 1, 2006.
- LEWIS, D.H., PLUMB, J.A. Bacterial disease. Principal diseases of farm-raised catfish. Auburn: **Souther Coop. Ser. Alabama Agriculture** Exp. Stn, p.115-124, 1979.
- 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**, v. 74. p. 105-112, 2001.
- MAZZUCO, H.; SILVA, R. D.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, E. Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. **Scientia agrícola**, v. 53, p. 1-5, 1996.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 215-234, 2000.
- ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C. Informações sobre a presença de contaminantes na própolis. Disponível na Internet: apis.sebrae.com.br, 2005.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L., 1998. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, New York, v. 36, n. 1, p. 24-28.
- PEREIRA, A.S. et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** v. 25 n. 2, p. 321-326, 2002.
- PLUMB, J.A. **Health maintenance of cultured fishs. Principal microbial diseases**. USA: CRC, p. 254, 1994.
- PRADO FILHO, L.G.; AZEVEDO, J.L.; FLECHTMANN, C.H. Antimicrobianos em própolis de *Apis mellifera* l. **Boletim da Indústria Animal**, v. 20, p. 399-403, 1962.
- RIGHI, A.A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileiras**. 2008. 102f. Tese (Mestrado em Ciência na área de botânica) – Programa de Pós-graduação em Ciências, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- SAAVEDRA, M.J., GUEDES-NOVAIS, S., ALVES, A., REMA, P., TACÃO, M., CORREIA, A., MARTINEZ-MURCIA. Resistance to β -lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Microbiology**. v. 7, p. 207-11, 2004.

- SFORCIN, J.M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 73, n. 1-2, p. 243–249, 2000.
- TAYLOR, P.W.; STAPLETON, P.D.; PAUL, L.J. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, New York, v. 7, n. 1, p. 1086-1091, 2002.
- VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000.

CAPÍTULO 1

Própolis, uma alternativa natural

(a ser submetido para Revista Ciência Rural)

Própolis, uma alternativa natural

Própolis, an natural alternative

Nara Patrícia Cavalcanti Andrade^I, Mateus Matiuzzi da Costa^{II*}, Márcia de Fátima Ribeiro^{III}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Própolis é uma substância resinosa cuja composição química é complexa e variada por estar relacionada à flora e o período de coleta pelas abelhas *Apis mellifera*. Dessa forma observa-se uma grande variedade de cores e componentes nos diferentes tipos de própolis. A própolis possui várias atividades farmacológicas, tais como: antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e antitumoral. Atualmente, o Brasil é o maior exportador de própolis do mundo, exportando para os Estados Unidos, Europa e Japão. O controle de sua qualidade e a padronização das própolis tem se tornado uma grande preocupação para cientistas e consumidores, principalmente em relação aos tipos de própolis brasileiras, uma vez que neles já foram encontrados compostos de grande interesse antimicrobiano. Estudos sobre a composição química dos tipos de própolis relacionando-os com a atividade biológica são necessários para definir suas aplicações nos futuros usos terapêuticos. O objetivo deste artigo foi revisar informações acerca de algumas das atividades farmacológicas da própolis, a qual vem sendo usada com fins terapêuticos desde a antiguidade, em vários países do mundo.

Palavras-chave: abelhas melíferas, composição química, bactéria, terapia.

Recebido em de de 2010.

Aceito para publicação em de 2010.

^IMestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil.

^{II}Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil. *Autor para correspondência: mateus.costa@univasf.edu.br.

^{III}Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA Semiárido BR 428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23. Petrolina, PE - CEP 56302-970, Brasil.

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance whose chemical composition is complex and varied for being related to the flora and period of collection by *Apis mellifera* bees. In this way, one can observe a large variety in colors and compounds in the different kinds of propolis. Propolis has several pharmacological activities as antimicrobial, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory, antifungal and antitumoural. Nowadays Brazil is the largest exporter of propolis in the world exporting to United States of America, Europe and Japan. The quality control and standardization of propolis has become a big concern to scientists and consumers, mainly for the Brazilian kinds of propolis since on those are found compounds of large pharmacological interest. Studies on propolis' chemical composition and the relationship to its biological activity are necessary in order to define future therapeutic uses. The objective of this article was to review information on some pharmacological activities of propolis, which has been used with therapeutic finality in several countries around the world since ancient eras.

Key Words: propolis, honey bees, chemical composition, bacteria, therapy.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas, com sua capacidade seletora, coletam das plantas, resinas com várias substâncias protetoras e acrescentam ácidos graxos insaturados e uma enzima produzida por suas glândulas salivares, produzindo assim a própolis, uma substância de elevada qualidade. Dessa forma, a própolis se constitui num exemplo de extrato de origem vegetal, elaborado de forma natural pelas abelhas (*Apis mellifera*) para vedar aberturas e controlar microrganismos em suas colônias (CUETO, 1989). O objetivo deste trabalho foi revisar os conhecimentos acerca da própolis e de algumas de suas atividades farmacológicas, para melhor utilizá-la como uma alternativa terapêutica em animais.

2. Origem, composição e classificação da própolis

Coletada de exsudados resinosos, brotos e botões florais pelas abelhas, a própolis é resinosa e balsâmica, contendo cera, óleos essenciais, grãos de pólen, microelementos e vitaminas (PARK et al., 2002). As abelhas propolisadoras (que estão, geralmente, na última fase da vida) coletam as resinas raspando-as das plantas com suas mandíbulas e manipulando esse material com as pernas. Elas trituram e amolecem a resina com o auxílio do ácido 10-hidroxicenóico, uma substância produzida nas glândulas salivares. Terminam por fixarem-na em suas corbículas (estruturas presentes no terceiro par de pernas e que auxiliam no transporte de pólen e resina) e a transportam para suas colônias (COSTA & OLIVEIRA, 2005). As abelhas operárias transformam estas resinas em própolis por meio da adição de cera, pólen e produtos do seu metabolismo, como as secreções das glândulas hipofaríngeas, principalmente as enzimas β -glicosidases (PARK et al., 2002; STRADIOTTI et al., 2004).

Essa substância é utilizada na colméia, principalmente para cobrir rachaduras, ficando a colônia hermeticamente fechada, impedindo a entrada de visitantes indesejáveis e permitindo melhor isolamento térmico. Além disso, as abelhas também usam a mesma para recobrir totalmente pequenos animais e insetos invasores, embalsamando-os e impedindo sua decomposição pútrida (GHISALBERTI, 1979; DONADIEU, 1980).

Desde a antiguidade, a própolis vem sendo utilizada pela humanidade como um produto terapêutico (KUJUMGIEV et al., 1999). Devido as suas propriedades antiputrefativas, os egípcios a utilizavam para embalsamar cadáveres. Médicos gregos e romanos a reconheceram por suas propriedades medicinais (CAPASSO & CASTALDO, 2002). A própolis foi utilizada, na segunda guerra mundial, e também na guerra ao final do século XIX na África do Sul (PEREIRA et al., 2002). Até 1980, a própolis não tinha adquirido popularidade, sendo usada a partir daí como um produto da medicina alternativa nos países da América do Sul e do Norte, Europa Ocidental e Japão (SALATINO et al., 2005).

Entretanto, a própolis não tem sua utilização mais amplamente difundida, devido a diversos fatores, dentre eles estão a variabilidade das amostras, que está associada aos diferentes tipos de flora de onde são coletadas; as diferentes formas de extração, concentrações e solventes; e ainda as diferentes técnicas empregadas na determinação de seus componentes químicos (GARCIA et al., 2004b). PARK et al. (2002) atribuem a complexidade e variação na composição química da própolis à flora de cada região visitada pelas abelhas, e DOS SANTOS et al. (2003), a época de coleta da resina. A fonte vegetal que predomina na composição da própolis na América do Norte, Europa e oeste da Ásia é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.). Já na América do Sul, existe uma maior diversidade de fontes vegetais, o que dificulta o estabelecimento de uma relação entre a própolis e os vegetais produtores de resina (PARK et al., 2002).

COSTA & OLIVEIRA (2005) afirmam que a coloração e a composição da própolis dependem da origem do material coletado, refletindo a variedade da vegetação próxima a colônia. A coloração é variável do verde-amarelado até preta. Ela em geral possui 50% de resina e bálsamo de vegetais, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias.

No entanto, a aplicação terapêutica precisa de padronização e de controle de qualidade, o que torna difícil devido a grande variabilidade em função da sua origem vegetal, sua localização e de diferentes condições ambientais (PARK et al., 2002). TRUSHEVA et al. (2006) relatam o crescente interesse de pesquisadores a respeito da composição química das própolis brasileiras, decorrente das diferenças entre estas e as obtidas nas zonas temperadas.

PEREIRA et al. (2002) compilaram dados de 100 anos de pesquisa sobre a própolis e suas perspectivas de uso, e afirmaram que já foram identificados mais de 300 constituintes em diferentes tipos. Entre estes constituintes estão os ácidos aromáticos e graxos, os flavonóides e os fenóis. Os vários compostos fenólicos, aos quais se devem os seus efeitos farmacológicos são do reino vegetal (BANKOVA et al., 1983; BANKOVA et al., 1992). BANKOVA et al. (1995); WOISKY et al. (1998); MARCUCCI et al. (1999) e SEIXAS et al. (2000) relatam que na própolis os ácidos fenólicos são mais abundantes que os flavonóides. O ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e o ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano são os mais encontrados. Minerais como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício, vitaminas B₁, B₂, B₆, C, e E (MARCUCCI, 1996), e os açúcares como arabinose, frutose, glicose, sacarose e maltose (BONVEHI et al., 1994), são encontrados em amostras de própolis. Dentre os flavonóides, os mais encontrados e estudados são: quercetina, pinocembrina, rutina, vanilina, acacetina, galangina, apigenina, rhamnetina e chrisina (BANKOVA et al., 1982; BONVEHI et al., 1994). Muitas das substâncias já

identificadas estão presentes em todas as amostras de própolis, mas algumas são peculiares à flora típica de onde estas foram coletadas (VARGAS et al., 2004).

Doze grupos de própolis brasileiras já foram classificadas de acordo com a composição físico-química e propriedades biológicas, sendo cinco grupos do Sul (dois do Rio Grande do Sul e três do Paraná), um do Sudeste (São Paulo) e seis do Nordeste brasileiro (dois da Bahia, dois de Pernambuco, um do Ceará e um do Piauí) (PARK et al., 2002; ALENCAR, 2002). DAUGSCH et al. (2006), descobriram o 13º grupo de própolis que foi denominado de própolis vermelha por ser oriunda do exsudato vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae), popularmente conhecida como verônica. Esta planta é encontrada em beiras de rios e ao longo do mar na região do Nordeste do Brasil. Segundo RIGHI (2008), as amostras de Pirenópolis-GO e Picos-PI compõem um provável 14º grupo, pela semelhança da presença de muitos flavonóides glicosilados. Nas amostras de Ponta Grossa-PR, Mira bela-MG e Pariquera-Açu-SP aparece o 15º grupo, com composição intermediária entre própolis verde e com flavonóides glicosilados.

3. Atividade antimicrobiana da própolis

As propriedades terapêuticas da própolis mais estudadas são: antimicrobiana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral e anti-HIV (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA et al., 1989; PARK et al., 1998; KUJUMGIEV et al., 1999; ITO et al., 2001; SOUZA et al., 2006). A atividade antimicrobiana tem sido a mais estudada, em relação às demais propriedades biológicas, sendo consenso entre os autores que a própolis tem atividade limitada contra bactérias gram negativas, e é mais ativa contra bactérias gram positivas (GARCIA et al., 2004a).

KROL et al. (1993) estudaram várias frações de um extrato etanólico de própolis e observaram que isoladamente estas não tiveram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, mas todas juntas foram capazes de inibir o patógeno. Isto comprova que o sinergismo entre os componentes das própolis é responsável pelo seu potencial terapêutico.

PARK et al. (1998), estudaram preparações variadas de extratos de própolis, suas aplicações e atividades, através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e observaram que a maioria dos flavonóides identificados foram: quercetina, kanferide, isoramnectina, acacetina e pinocembrina extraídos entre 60% e 80% de etanol. Observando ainda que a atividade antimicrobiana satisfatória foi dada também a esse percentual.

O efeito da própolis para determinados gêneros de bactérias tem se revelado altamente inibitório, contra bactérias gram positivas como, por exemplo, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*. Esta é parcialmente efetiva ou inativa em relação a grupos gram negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (GRANGE & DAVEY, 1990; MARCUCCI et al., 2001).

UZEL et al. (2005), observaram atividade antimicrobiana da própolis contra *Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *S. mutans*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *C. tropicalis*, *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa*, sendo que os principais compostos encontrados nas própolis eram os flavonóides (pinocembrina, pinostropina, isalpinina, pinobanksina, quercetina, naringenina, galangina e crisina).

A galangina e a pinocembrina são componentes ativos contra o *Bacillus subtilis* (PEPELJNJAK et al., 1985). UZEL et al. (2005), pesquisando a composição química e atividade antimicrobiana de quatro diferentes amostras de própolis, observaram uma provável inibição da enzima RNA polimerase bacteriana, acionada pelo ácido caféico.

SCAZZOCCHIO et al. (2006) também acharam provável que o ácido caféico, além de outros como ácido benzóico e ácido cinâmico, alterem a estrutura da célula bacteriana.

GOULART (1995) testou um extrato etanólico de própolis do Estado da Bahia, frente a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais, observando a sensibilidade em *Corynebacterium pyogenes* e *S. aureus* (gram-positivas), e resistência em *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (gram-negativas). Conhece-se a complexidade química, menor rigidez e maior teor lipídico da parede celular de bactérias gram-negativas, mas ainda não se sabe com certeza o porquê da menor atividade dos extratos de própolis contra estas bactérias (VARGAS et al., 2004).

MIRZOEVA et al. (1997) verificaram que a própolis apresentou atividade antimicrobiana contra isolado de *Rhodobacter sphaeroides* (bactéria gram-negativa), relatando que a atividade da própolis depende de cada espécie de bactéria, possivelmente devido a variações na composição de porinas e lipopolissacarídeos, constituintes da membrana externa. O equilíbrio do potencial de membrana é essencial para as bactérias, pois é através dela que ocorre o transporte de nutrientes entre o meio externo e o interno, a síntese de ATP e a motilidade. Neste mesmo trabalho, os constituintes da própolis como o Éster Fenil do Ácido Caféico (CAPE) foi examinado separadamente sendo constatado como o inibidor de motilidade mais potente na concentração de 20 μ M, seguido por quercentina, naringerina e ácido caféico. A motilidade é um importante fator de virulência, por guiar as bactérias aos seus sítios de aderência e invasão no hospedeiro, podendo assim a ação dos componentes da própolis, inibir a patogenicidade bacteriana, e o desenvolvimento de infecções.

Segundo TAKAISI-KIKUNI & SCHILCHER (1994), estudando a ação da própolis sobre *Streptococcus agalactiae*, através de micro-calometria e microscopia eletrônica concluíram que há uma complexidade da ação da própolis sobre a bactéria. A mesma causou a divisão celular, através da lise, desorganizou a parede, a membrana citoplasmática e o citoplasma da célula, inibindo assim a síntese protéica, conseqüentemente o desenvolvimento bacteriano.

ORSI et al. (2005) estudaram os extratos alcoólicos de própolis de duas regiões brasileiras, Mossoró-RN e Urubici-SC, frente a isolados de *Salmonella* spp. e verificaram ação antimicrobiana após 24 horas de incubação para os dois tipos de extratos. Concluíram que a melhor ação foi do extrato de Mossoró-RN e que a própolis, dependendo de sua região geográfica, possui atividade contra bactérias gram-negativas. Dois anos depois, ORSI, et al. (2007), demonstraram ação antimicrobiana para todos os sorovares testados de *Salmonella* spp., utilizando extrato alcoólico de própolis brasileira e búlgara. Observaram ações similares entre as própolis dos dois países e uma maior sensibilidade da *S. enteritidis* isolada de alimentos, do que da *S. typhimurium*, isoladas de infecção humana.

VARGAS et al. (2004), trabalhando com a própolis de apiários comerciais da cidade de Santa Maria-RS, encontraram 100% de sensibilidade com o isolado de *Nocardia asteroides*, 97,83% para *Staphylococcus* spp., 80,95% para *Streptococcus* spp., 80% para *Rhodococcus equi* e 72,41% para *P. aeruginosa*, sendo esse o maior percentual entre as bactérias gram-negativas testadas.

LANGONI et al, (1996) estudando o efeito antimicrobiano *in vitro* de própolis, observaram uma sensibilidade de 100% para os isolados de *S. aureus*, *Corynebacterium* spp., *C. albicans*, *Enterobacter aerogenes*, além de 91% para *E. coli*, 90% *S. agalactiae*, 87,5% para *Klebsiella pneumoniae*, 85,7% *P. aeruginosa* e 81,3% para *Salmonella* spp.

LOGUERCIO et al. (2006), avaliando a atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina concluíram que 94,4% dos *Staphylococcus* spp. e 85,2% dos *Streptococcus* spp. estudados foram susceptíveis ao extrato alcoólico de própolis.

As amostras de própolis testadas frente a *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli* por BONVEHI et al. (1994), que ao estudarem os componentes ativos e a atividade bacteriostática de própolis, obtiveram uma maior Concentração Inibitória Mínima (CIM) do que a tetraciclina.

SHUB et al. (1981) pesquisaram combinações dos antibióticos, benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina com própolis sobre cepas de *Staphylococcus* spp.. Estes autores concluíram que as bactérias foram resistentes aos antibióticos e sensíveis à própolis, e que não houve efeito sinérgico entre própolis e as drogas antimicrobianas.

4. Estudos *in vivo* da atividade da própolis em animais

Alguns componentes como ácidos fenólicos e flavonóides, aos quais são atribuídas as ações biológicas da própolis e que se solubilizam em álcool, podem provocar intoxicação e hipersensibilidade em indivíduos sensíveis (GARCIA et al., 2004b). BURDOCK (1998) estudou o efeito tóxico da própolis em 90 camundongos na dosagem de 1400 mg/kg peso vivo, mas não foi observado essa reação nestes animais, embora o autor cite que são comuns os relatos de reações alérgicas.

Extrato de própolis a 0,1% administrada junto a ração peletizada melhorou a conversão alimentar e o ganho de peso de coelhas jovens da raça Norfolk 2000 (GARCIA et al., 2004b). Entretanto, os mesmos autores observaram que a ração contendo 0,3% do extrato seco de própolis apresentou influência negativa, provavelmente por alterações causadas no metabolismo dos animais. Uma ação estimulante no apetite de 60 leitões desmamados foi observada por SANCHEZ e GALARDI (1989) testando emulsão aquosa de própolis a 10% via oral. Os resultados mostraram um maior ganho de peso nos animais tratados.

ARAUCO et al. (2007) pesquisaram o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) e observaram nos animais que receberam o extrato de própolis, uma metamorfose acelerada e uma influência positiva no ganho de peso. MEURER et al. (2008), observando o extrato da própolis marrom como promotor de crescimento sobre desempenho de alevinos de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), chegaram a conclusão que o extrato na quantidade de 24,3 ml/ Kg de ração tem efeito positivo sobre o desempenho dos mesmos. AZZA (2009) introduziu *A. hydrophila*, em tilápias-do-Nilo por via intraperitoneal e concluiu que os peixes alimentados com própolis na ração por 28 dias, mostraram maior crescimento, conversão alimentar, imunidade e resistência contra esse patógeno.

FUMERO et al. (1989), comparando um produto comercial a base de própolis com o antibiótico oximicina em bezerros com diarreia, onde o foco do local era salmonelose e colibacilose, obtiveram uma eficiência de 100% do produto comercial a base de própolis após 72 horas e efeitos tardios para a oximicina.

5. Estudos da atividade imunomodulatória

Através do aumento ou da diminuição de componentes do sistema imunológico pode ser observada o fenômeno da imunomodulação (KIRKLEY, 1999). SFORCIN et al. (2005), observaram que a habilidade em modular a síntese de anticorpos é parte da atividade imunoestimulante da própolis. PEREZ (1989), pesquisando a influência de doses de própolis na resposta imune em coelhos encontrou melhores resultados em doses mais baixas de própolis, onde os mesmos apresentaram maiores níveis de imunoglobulinas, em relação as doses mais elevadas.

Segundo PARK et al. (2004) a ação do composto ativo Éster Fenil do Ácido Cafêico (CAPE) pode ter efeito imunomodulador *in vivo*. A ativação de macrófagos aumenta a capacidade fagocítica e é associada a imunomodulação promovida pela própolis (ORSOLIC & BASIC, 2003; ORSI et al., 2000) e estimula a secreção de citocinas, tais como o fator de necrose tumoral, e outras substâncias como o óxido nítrico e espécies reativas do oxigênio (DIMOV et al., 1992; IVANOVSKA et al., 1995; ORSI et al., 2000; KHAYAL et al., 2003).

Segundo VIVIER et al. (2004), as células exterminadoras naturais (EN) têm um papel importante no combate à infecções virais e células tumorais. SFORCIN et al. (2002) pesquisando amostras de própolis brasileira, observaram no baço de camundongos um aumento na atividade dos linfócitos contra células tumorais. Estes autores sugeriram que macrófagos ativados poderiam produzir citocinas como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e interleucina 12, que agem nas células EN, aumentando a sua atividade citotóxica.

DIMOV et al. (1991), trabalharam com um derivado hidrossolúvel de própolis da Bulgária, pesquisando a sua ação imunomodulatória, e mostraram em infecções experimentais em camundongos por *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*, que o derivado hidrossolúvel estimulou macrófagos peritoniais a produzirem a interleucina -1. Por outro lado este falhou em induzir a proliferação de linfócitos e concluíram que a própolis aumenta a defesa não específica do hospedeiro por ativação de macrófagos.

SÁ-NUNES et al. (2003), observaram que flavonóides encontrados na própolis podem inibir a proliferação de linfócitos em camundongos. Pesquisando a atividade do extrato hidroalcoólico de própolis na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) ARAUCO et al. (2007), observaram uma influencia significativa dos monócitos pela própolis, comparando com os linfócitos, basófilos, neutrófilos e eosinófilos que não apresentaram diferença significativa.

AZZA (2009) pesquisando extrato alcoólico de própolis em tilápias-do-Nilo após o desafio com *A. hydrophila*, observou um aumento significativo da atividade da lisozima sérica, quando comparados com o grupo controle. Esta atividade provoca a hidrólise do ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, constituintes da camada de peptidoglicano da parede celular bacteriana e concluíram que o extrato pesquisado é imunoestimulador em tilápias-do-Nilo.

6. CONCLUSÕES

A maior biodiversidade do mundo, com clima tropical ou subtropical, encontra-se no Brasil. Devido ao fato das abelhas produzirem própolis através da coleta de resinas de uma flora variada, as amostras brasileiras são vistas como as melhores do mundo. Isto se comprova através dos diversos compostos químicos encontrados nestas amostras, determinando assim as suas atividades farmacológicas.

A eficácia antimicrobiana dos extratos de própolis, quando testados frente a bactérias gram positivas e gram negativas é diferente. Estas ações têm sido relacionadas principalmente a sua composição química, como os ácidos fenólicos e flavonóides. É possível que os compostos fenólicos ativem ou aumentem a atividade da lisozima sérica, a qual desestabiliza a parede celular bacteriana. Estas ações podem variar devido a sensibilidade de cada grupo de bactéria.

7. PERSPECTIVAS

Há uma escassez de pesquisas com o uso das própolis em animais. Somente através de estudos detalhados será possível chegar a uma certificação da própolis. Assim, mesmo com origens nas mais variadas floras, será possível identificar os compostos químicos que promovam as melhores ações farmacológicas.

O uso dos extratos de própolis como uma alternativa terapêutica poderá impulsionar a melhoria da saúde animal, uma vez que drogas antimicrobianas sintéticas, que ainda são largamente utilizadas, têm levado à resistência antimicrobiana e poderiam ser substituídas pela própolis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S.M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ARAUCO, L.R.R. et al. Efeito do extrato hidroalcoólico de própolis no desempenho e na composição leucocitária do sangue de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 29, n. 2, p. 227-234, 2007.

AZZA M.M. ABD-EL-RHMAN. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 27 p. 454–459, 2009.

BANKOVA, V.S. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journal of Chromatography**, v. 242, p. 135-143, 1982.

BANKOVA, V.S. et al. A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 471-474, 1983.

BANKOVA, V.; POPOV, S. MAREKOV, N.L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry**, v. 28, p. 871-873, 1989.

BANKOVA, V.S. et al. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 607, n. 150, 1992.

BANKOVA, V.S. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tübingen v. 50c, n. 3-4, p. 167-172, 1995.

BONVEHI, J.S. et al. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 71, n. 5, p. 529-532, 1994.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia** v. 73, p. 1-6, 2002.

COSTA, P.S.C.; OLIVEIRA, J.S. **Manual prático de criação de abelhas**, Viçosa-MG, 1ª ed. p.309 a 346. 2005.

CUETO, D.J. Experiência clínica de los medicamentos elaborados com propoleo. In: ASIS, M., INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: MEMÓRIAS DEL 1º

SIMPÓSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EM LA SALUD HUMANA Y ANIMAL. 1988. Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, p. 259-262, 1989.

DAUGSCH, A. et al. **Própolis Vermelha e sua origem botânica**. 2006. Mensagem Doce, n. 89. Capturada em Janeiro de 2010. Disponível na Internet: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>.

DIMOV, V. et al. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. **Vaccine**, v. 10, n. 12, p. 817-823, 1992.

DIMOV, V. et al. Immunomodulatory action of própolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v. 22, n. 2, p. 155-162, 1991.

DONADIEU, Y. **La propolis**. Paris: Maloine. p. 14-15. 1980.

DOS SANTOS, C.R. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 71-74, 2003.

FUMERO, A.P. et al. Diarrea infecciosa del ternero: Resultados Preliminares de los tratamientos con NB-1 (una modificación de CNB-R5). In: SIMPOSIO INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, 1., 1988, Varadero. Matanzas. Memórias... Varadero: Consejo Científico Del Instituto de Medicina Veterinária, 1989. p. 150-153.

GARCIA, R.C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida in vitro* e em coelhos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, no. 1, p. 69-77, 2004a.

GARCIA, R.C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 26, n. 1, p. 57-67, 2004b.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.

GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. 1995. 18f. Monografia - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.

ITO, J. et al. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new mellifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1278-1281, 2001.

IVANOVSKA, N.D. et al. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 135-143, 1995.

KHAYAL, M.T. et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, p. 93-102, 2003.

KIRKLEY, S.A. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 5, p. 652-657, 1999.

KROL, W. et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneim-Forsch Drug Res**, v. 43, n. 5, p. 607-609, 1993.

KUJUMGIEV A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64 p. 235-240, 1999.

LANGONI, H. et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* da própolis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 2, p. 227, 1996.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C. et al. Isolamento e identificação de uma substância fenólica em própolis brasileira, por CLAE. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22. 1999, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos**. Poços de Caldas, 1999. v. 2, PN-139.

MARCUCCI, M.C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2001.

MEURER, F. et al. Extrato da própolis marrom como promotor de crescimento sobre desempenho de alevinos de Tilápia-do-Nilo. In: 45ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Anais...** Lavras, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2008 (CD-ROM).

MIRZOEVA, O.K. et al. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

ORSI, R.O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, n. 2, p. 205-219, 2000.

ORSI R. O. et al. Susceptibility profile of *salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins incl. Trop. Dis.** v. 11, n. 2, p. 109-116, 2005.

ORSI R. O. et al. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars **Journal of Venomous Animals and Toxins incl. Trop. Dis.** v. 13, n. 4, p. 748-757, 2007.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 265-273, 2003.

PARK, Y.K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 313-318, 1998.

PARK, Y.K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003, 2002.

PARK, J.H. et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **Internacional Immunopharmacology**, v. 4, p. 429-436, 2004.

PEPELJNJAK, S. et al. Flavonoid content in propolis extrats and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. **Pharmazie**, v. 40, n. 2, p. 122-123, 1985.

PEREIRA, A.S. et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** v. 25 n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREZ, I.; SOL, A. Influencia de las dosis parenteral de propoleo sobre la respuesta imune (RES), en conejos. In: ASIS, M. INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: MEMORIAS DEL 10 SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL. 1988. Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, 1989, p. 230-3.

RIGHI, A.A. **Perfil químico de amostras de própolis brasileiras**. 2008. 102f. Tese (Mestrado em Ciência na área de botânica) – Programa de Pós-graduação em Ciências, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **e CAM** 2: 33-38. 2005.

SANCHEZ, M.; GALARDI, R. Influencia del propoleo em la conversión de lechones destetados. In: ASIS, M. INVESTIGACIONES CUBANAS SOBRE EL PROPOLEO: MEMORIAS DEL 10 SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL. 1988 Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, 1989, p. 211-214.

SÁ-NUNES, A. et al. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 93-97, 2003.

SEIXAS, F. R. M. S. et al. Composição química da própolis brasileira das regiões sul e sudeste. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas, MG. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas, 2000. v. 2, PN-050.

SCAZZOCCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiology Research**, v. 4, p. 327-333, 2006.

SFORCIN, J.M. et al. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 1, p. 19-29, 2002.

SFORCIN, J.M. et al. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 3, p. 301-305, 2005.

SHUB, T.A. et al. Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. **Antibiotiki** v. 26, p. 268-271, 1981.

SOUZA, G.T.; BISCAIA, D.; FERREIRA, S.R.S. Avaliação do rendimento e atividade antioxidante dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes. **Anais 58ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC - Florianópolis, SC. Julho/2006.**

STRADIOTTI, D. et al. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 1086-1092, 2004.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Eletron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta médica**, Stuttgart, v.60, p.222-227, 1994.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **e CAM**, v. 3, p. 249-254, 2006.

UZEL, A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VIVIER, E. et al. Natural killer cell signaling pathways. **Science**, v. 306, p. 1517-1519, 2004.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

CAPÍTULO 2

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de própolis de três Estados brasileiros sobre cepas de *Aeromonas* spp. isoladas de peixes

(a ser submetido para a revista: Pesquisa Veterinária Brasileira)

Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas* spp. obtidas de peixes¹

Nara P. Cavalcanti Andrade², Mateus Matiuzzi da Costa^{3*}, Márcia de Fátima Ribeiro⁴

ABSTRACT.- Andrade N.P.C., Ribeiro M. F. & Costa M.M. 2010. [*In vitro* antimicrobial activity of propolis ethanolic extracts of three brasilian states on *Aeromonas* spp. obtained from fish] Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas* spp. obtidas de peixes. Revista Pesquisa Veterinária Brasileira 00(00):00-00. Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil. E-mail: mateus.costa@univasf.edu.br

Aquaculture is an emergent economic activity in Brazil and in the world. The increase in the intensive breeding of several fish species contribute to the occurrence of infectious diseases and the selection of resistant microorganisms. The present study had the purpose to evaluate the *in vitro* sensibility of *Aeromonas* spp. to propolis ethanolic extracts of (one green and two brown) from three Brazilian states (Minas Gerais, Ceará, and Pernambuco). In order to verify the *in vitro* antimicrobial activity of propolis, 15 *Aeromonas* spp. isolates were tested to determine the Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of the extracts. Ethanol at 70% was used as control. Survival curves to the bacterial growth were determined by incubation of the isolates in 15% ethanolic extracts of propolis at 15% for 24 hours. The averages of the MBC of propolis extracts were 1.68 % to the green propolis of Minas Gerais, 2.31% to the brown propolis of Ceará, and 3.75% to the brown propolis of Pernambuco. The survival curve of the isolates showed a partial inhibition of propolis extracts with up to three hours of incubation. This result is compatible with the bacteriostatic effect of propolis.

INDEX TERMS: aquaculture, *Aeromonas* spp., resistance, antimicrobials

¹Recebido em de de 2010.

 Aceito para publicação em de 2010.

²Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil.

³Campus Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543. Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n. Petrolina, PE 56300-990, Brazil. *Autor para correspondência: mateus.costa@univasf.edu.br.

⁴Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA Semiárido BR 428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23. Petrolina, PE - CEP 56302-970, Brasil.

RESUMO

A aquicultura é uma atividade econômica emergente no Brasil e no mundo. O aumento na criação intensiva de diversas espécies de peixe contribui para a ocorrência de doenças infecciosas bem como seleção de microrganismos resistentes. O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* de *Aeromonas* spp. frente a extratos etanólicos de própolis (uma verde e duas marrons) obtidos em três estados brasileiros (Minas Gerais, Ceará e Pernambuco). Para verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis, 15 isolados de *Aeromonas* spp. foram testados para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos. Etanol a 70% foi utilizado como controle. Curvas de sobrevivência para o crescimento bacteriano foram determinadas pela incubação dos isolados em extratos etanólicos de própolis a 15% por 24 horas. As médias da CBM dos extratos de própolis foram 1,68 % para a própolis verde de Minas Gerais, 2,31% para a própolis marrom do Ceará e 3,75% para a própolis marrom de Pernambuco. A curva de sobrevivência dos isolados demonstrou uma inibição parcial dos extratos de própolis com até três horas de incubação. Este resultado é compatível com o efeito bacteriostático da própolis.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: aquicultura, bactérias, resistência, antimicrobianos

1. Introdução

A aquicultura é a atividade zootécnica de grande crescimento mundial (Tsukamoto & Takahashi 1992). Através do desenvolvimento da piscicultura intensiva no Brasil observa-se o aumento da prevalência de doenças nos sistemas de produção (Costa 2003). Quando os peixes encontram-se em condições desfavoráveis, as bactérias, que são patógenos oportunistas, infectam os mesmos, pois elas estão disseminadas no ambiente aquático (Barja & Esteves 1988).

As bactérias *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio anguillarum* e *Edwardsiella tarda* fazem parte do ambiente aquático, da pele, brânquias e intestino dos peixes, sendo que quando há desequilíbrio dos sistemas hospedeiro-ambiente, estas causam doenças nos mesmos (Barja & Esteves 1988). Perda de apetite, apatia e perda de equilíbrio, lesões epidérmicas com despigmentação, necrose da pele e úlceras com exposição da musculatura e alterações no comportamento são geralmente observadas como sinais clínicos da infecção por *A. hydrophila* (Plumb 1994). *Aeromonas* spp. são consideradas bactérias patogênicas para várias espécies de peixes e sua resistência aos beta-lactâmicos é crescente (Saavedra et al. 2004).

O uso indiscriminado de drogas antimicrobianas, tanto para a terapia de doenças, como para promoção de crescimento, seleciona bactérias resistentes. Além da seleção natural de bactérias resistentes após a morte das sensíveis, há também a possibilidade da transferência dos genes de resistência à outras que nunca foram expostas a tal antibiótico (Verschuere et al. 2000). Segundo Franco et al. (2007), estudos na elaboração de novos aditivos têm sido realizados na intenção de substituir estes promotores de crescimento.

As abelhas possuem capacidade seletora, sendo que coletam as resinas de que necessitam das plantas. Estas resinas possuem um eficiente poder protetor, uma vez que

possuem produtos de elevadas qualidades antimicrobianas e imunológicas. As abelhas transformam estas substâncias em própolis adicionando uma enzima produzida por suas glândulas salivares e fornecendo-lhes ácidos graxos insaturados. Dessa forma, a própolis constitui-se um exemplo de extrato de origem vegetal, elaborado de forma natural pelas abelhas (*Apis mellifera*) para vedar aberturas e controlar microrganismos em suas colônias (Cueto 1989).

Devido a atividade biológica como substância antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antimicrobiana e antitumoral a própolis vem sendo utilizada na medicina tradicional desde a antiguidade (Kujumgiev et al. 1999, Banskota et al. 2000, Sforcin et al. 2000 e Marcucci et al. 2001). Esta tem sido utilizada na preparação de medicamentos, em vários locais do mundo. Inicialmente foi utilizada na Europa e Ásia e recentemente em países da América do Sul, como Uruguai, Brasil e Argentina, e da América Central, como Cuba. A própolis pode substituir ou reduzir o uso de drogas antimicrobianas na área zootécnica por ter a vantagem de ser um produto natural (Garcia et al. 2004a).

Dentre as propriedades biológicas da própolis, a antimicrobiana tem sido a mais estudada. Autores afirmam que a própolis é ativa principalmente contra bactérias gram positivas e tem atividade limitada contra bactérias gram negativas (Garcia et al. 2004a).

Estudos com finalidade de esclarecer o efeito dos extratos de própolis contra *Aeromonas* spp. são necessários para utilizá-la como uma alternativa antibioticoterápica. Segundo Akinbowale et al. (2006) e Cabello (2006) o uso contínuo de antibióticos tem sido associado a riscos ao meio ambiente e à saúde pública. Assim a substituição destes por produtos naturais torna-se importante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de 15 isolados de *Aeromonas* spp., provenientes de peixes, frente a extratos etanólicos de própolis de três Estados brasileiros.

2. Material e Métodos

2.1.Local

Os isolados de *Aeromonas* spp., obtidos de peixes, eram pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF –Campus Ciências Agrárias - Petrolina-PE.

A própolis verde foi coletada em Minas Gerais (PV), e as marrons, respectivamente nos Estados do Ceará (PMCE) e Pernambuco (PMPE).

2.2.Preparo do Extrato de Própolis

Foram preparados extratos etanólicos da própolis verde e das própolis marrons através do padrão oficial para o extrato conforme metodologia descrita na INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, de 19/01/2001 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (maceração a frio de 300g de própolis bruta em 700mL de etanol 70%). A preparação foi estocada em temperatura ambiente e protegida da luz por um período de 45 dias. Após este período foi retirado o extrato, com o auxílio de um funil e filtro de papel previamente autoclavados. Os extratos foram então mantidos refrigerados em frascos âmbar até sua utilização.

2.3.Teste da Atividade Antimicrobiana *in vitro*

A determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* para bactérias aeróbicas dos extratos de própolis seguiu descrições do protocolo M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). Os extratos previamente preparados foram diluídos em

200µL (1:2) de caldo Muller-Hinton (MH) utilizando microplacas, nas proporções 15%, 7,5%, 3,75%, 1,88%, 0,93%, 0,46%, 0,23% e 0,12%. Na preparação do inóculo, colônias bacterianas em solução salina, foram utilizadas para a obtenção de uma suspensão com turvação equivalente a escala 0,5 de Mac Farland (10^6 Unidades Formadoras de Colônia). Desta suspensão foram transferidos 100µL para o tubo contendo 9,9ml também de solução salina, sendo que 10µL (10^4 UFC) foram colocados em cada poço contendo a diluição dos extratos de própolis. As microplacas foram incubadas a 27°C por 24hs. Após esse período foi retirada uma alíquota de 10µL de cada poço e semeada na superfície de ágar MH incubando-a novamente por mais 24hs a 27°C, para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), que foi considerada como a menor concentração dos extratos etanólicos em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para controle, o inóculo bacteriano foi aplicado à diluição de etanol a 70%.

2.4. Curva de sobrevivência

Para preparação dos inóculos, colônias bacterianas em solução salina foram utilizadas na obtenção de uma suspensão com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. De cada suspensão foram transferidos 100µL (10^6 UFC) para os respectivos tubos contendo 9,9ml também de solução salina, 1ml da suspensão de cada bactéria foi inoculado em cada um de uma série de 5 tubos contendo 3ml de Brain Heart Infusion (BHI) previamente autoclavados. No 1º tubo foi adicionado 150µL do extrato da própolis marrom do Estado de Pernambuco, no 2º a mesma quantidade do extrato do Estado do Ceará, no 3º o da própolis verde do Estado de Minas Gerais, no 4º, o etanol 70% e no 5º apenas o caldo BHI como controle. Após esse processo foi retirado 1ml com 3, 12 e 24 horas de incubação de cada tubo e colocados em tubos contendo 9ml de solução salina fazendo assim uma diluição decimal até

10⁻⁵. Na sequência foi retirado 1ml de cada tubo e semeados em placas de Petri, em Ágar Padrão de Contagem (PCA). As semeaduras foram realizadas em duplicata. Após incubação de 24h a 27°C o número de UFC foi determinado.

2.5. Análise Estatística

Para análise da Concentração Bactericida Mínima (CBM), o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos e 15 repetições (isolados de *Aeromonas* spp.). Já na análise da curva de sobrevivência o DIC foi em arranjo fatorial de 5 tratamentos x 4 períodos de avaliação e 15 repetições. Nas comparações da CBM foi aplicado o teste de Tukey (Zar 1999), e para as análises da curva de sobrevivência a ANOVA (programa STATISTICA, v. 5.0). Foi considerado o valor de significância de $P < 0,01$.

3.Resultados

3.1.Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos diferentes extratos de própolis

Os 15 isolados de *Aeromonas* spp. foram sensíveis aos extratos etanólicos dos três tipos própolis. As Concentrações Bactericidas Mínimas dos extratos de própolis encontram-se descritas na Tabela 1. A própolis verde foi a que apresentou maior atividade, com uma CBM média de 1,68%, a qual não diferiu estatisticamente ($P > 0,01$) da própolis marrom do Estado do Ceará com 2,31%. Contudo estas foram diferentes significamente ($P < 0,01$) da própolis marrom do Estado de Pernambuco, que obteve uma CBM média de 3,75%.

Tabela 1. Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis (verde, marrom do Estado do Ceará e marrom do Estado de Pernambuco) frente aos isolados de *Aeromonas* spp. obtidos de peixes.

Própolis	Concentração Bactericida Mínima (CBM)	
	Variação (%)	Média (%)
PV (MG)	0,46 - 3,75	1,68 ^a
PM (CE)	0,93 - 3,75	2,31 ^a
PM (PE)	1,88 - 7,5	3,75 ^b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,01$).

Legenda: PV: Própolis Verde do Estado de Minas Gerais, PMCE: Própolis Marrom do Estado do Ceará, PMPE: Própolis Marrom do Estado de Pernambuco.

3.2. Curva de sobrevivência bacteriana frente aos extratos de própolis

A análise da curva de sobrevivência das bactérias frente aos extratos de própolis demonstrou que a atividade antimicrobiana somente foi observada nas primeiras três horas de incubação. Foram observadas diferenças significativas estatisticamente entre os controles (BHI e BHI + etanol 70%) e os tratamentos (PV, PMCE e PMPE). O perfil da curva de sobrevivência dos 15 isolados de *Aeromonas* spp. frente aos extratos etanólicos das própolis, encontram-se descritos na figura 1. Entre os extratos, foi observada diferença significativa ($P<0,01$) entre a própolis verde e as duas própolis marrons. Entretanto não se observou diferença significativa ($P>0,01$) entre as duas própolis marrons. Após três horas de incubação verificou-se uma elevação significativa ($P>0,01$) nas contagens de *Aeromonas* spp. incubadas

tanto com os controles, bem como com as própolis marrons (10^9 UFC/ml) e a verde (10^8 UFC/ml).

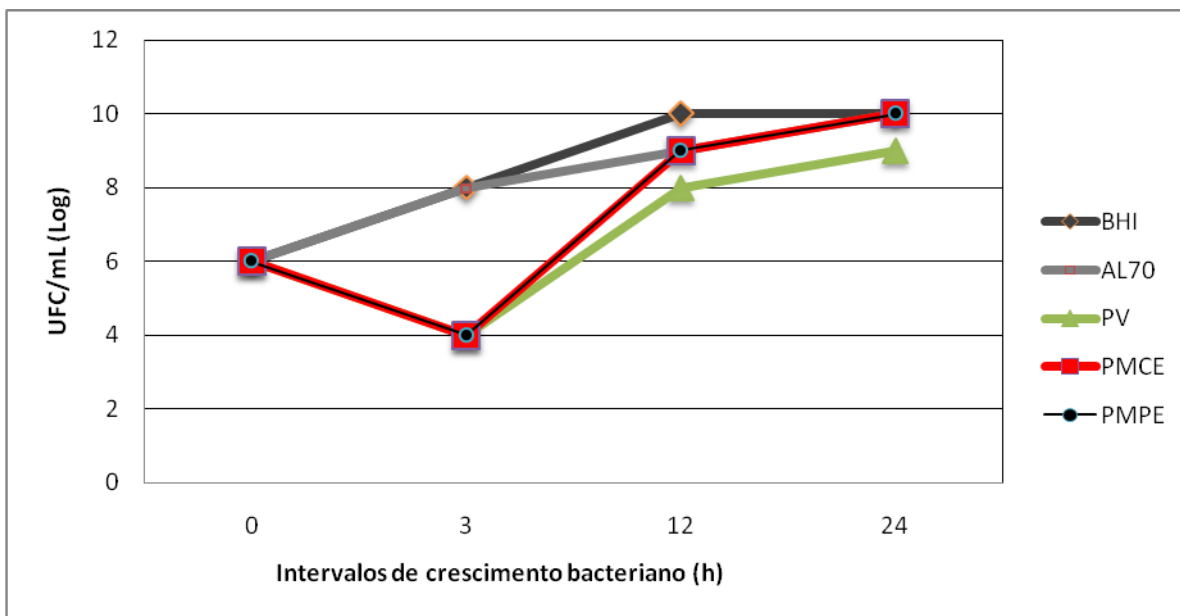


Fig. 1. Curva de sobrevivência dos isolados de *Aeromonas* spp. frente aos extratos etanólicos das própolis Verde (PV), Marrom do Estado do Ceará (PMCE), Marrom do Estado de Pernambuco (PMPE), Álcool a 70% (AL70) e do Brain Heart Infusion (BHI) (controle).

4. Discussão

Todos os isolados de *Aeromonas* spp. testados foram sensíveis a diferentes concentrações de própolis. Variações são descritas no poder antimicrobiano da própolis frente a bactérias gram positivas e gram negativas (Vargas et al. 2004, Loguercio et al. 2006). As diferenças de sensibilidade podem estar associadas à composição da parede celular, sendo que as bactérias gram-positivas possuem várias camadas de peptidoglicano, enquanto que as gram-negativas possuem uma camada fina e interna. Além desta camada, as bactérias gram negativas possuem uma membrana externa de lipopolissacarídeos e proteínas, o que dificulta a lise destas bactérias (Mirzoeva et al. 1997).

As CBMs obtidas em nosso estudo (1,68%, 2,31% e 3,75%) foram maiores que a concentração de 0,8% obtida por Azza (2009), com própolis do Egito frente a isolados de *Aeromonas* spp. de modo semelhante ao descrito no presente estudo. Esses resultados divergentes podem estar relacionados à diferença da flora e clima entre Brasil (tropical ou subtropical) e Egito (temperado), que afetariam a composição química da própolis.

Outros autores trabalhando com diferentes concentrações de própolis e bactérias obtiveram resultados diversos. Bianchini & Bedendo (1998), ao verificarem o efeito antimicrobiano de extrato aquoso de própolis a 10%, observaram elevado percentual de sensibilidade de isolados de *Erwinia chrysanthemi*, enquanto que a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* mostrou-se resistente. Vargas et al. (2004), encontraram sensibilidade em 42,5% das bactérias gram-negativas testadas ao extrato alcoólico a 50% de própolis. Mirzoeva et al. (1997) utilizando a própolis para observar a sensibilidade de bactérias gram-negativas, concluíram que a própolis apresentou efeito antimicrobiano contra *Rhodobacter sphaeroides*, e portanto, seus resultados foram semelhantes a este trabalho. As diferenças de sensibilidade à própolis, nos relatos da literatura, podem ser justificadas pelas variações na composição observadas das própolis de diferentes regiões, tipo de diluente e concentrações de teste (Park et al. 2002, Garcia et al. 2004b).

Ao analisarmos o resultado da curva de sobrevivência, quando da utilização do extrato de própolis a 15%, foi verificado efeito antimicrobiano apenas nas três primeiras horas de incubação, indicando um efeito bacteriostático, como recomendado por Cos et al. (2006), bem como pelo CLSI (2006). Além disso, a própolis verde apresentou maior redução nas contagens de UFC comparada com as própolis marrons. Estes resultados diferem de outros descritos na literatura, onde a própolis apresentou inibição total (efeito bactericida) de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* numa concentração de 3,0 e 2,0 mg/ml (Pinto 2000) e *Salmonella* spp. numa concentração de 8,54% (Orsi et al. 2007). Ao

verificarmos a dinâmica da curva de sobrevivência das *Aeromonas* spp. quando incubadas com os extratos de própolis podemos observar um padrão de subpopulações heteroresistentes, sendo que após um período de atividade inicial do composto antimicrobiano, deve ter ocorrido a seleção e multiplicação de bactérias resistentes. A heteroresistência é um fenômeno preocupante na saúde humana e foi descrita em diversos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* (Schwaber et al. 2003, Morand & Muhlemann 2007, Hawley et al. 2008). Contudo a heteroresistência dos isolados de *Aeromonas* spp. requer confirmação.

As diferenças entre os testes de atividade antimicrobiana realizados em nosso estudo (CBM e curva de sobrevivência) são evidentes e podem estar associados ao volume de inóculo utilizado na cultura bacteriana após incubação. A escolha dos testes para busca da atividade antimicrobiana é muito importante, uma vez que dos seus resultados dependem a validação de um composto como antimicrobiano (COS et al. 2006). Segundo (Hadacek & Greger 2000) os resultados de um teste de atividade antimicrobiana podem variar de acordo com o método escolhido, uma vez que a precisão de cada técnica é diferente.

As variações nos resultados dos extratos etanólicos das própolis obtidos neste trabalho podem estar associados à peculiaridade da flora de cada região, ao modo que foram coletadas, aos fatores climáticos ou até mesmo na mudança acentuada da flora dada pelo período de coleta, como foi sugerido por Park et al. (2002). A melhor atividade antimicrobiana observada com a Própolis Verde pode ter sido devida à presença de *Baccharis dracunculifolia*, estudada por vários autores por suas atividades antimicrobianas (Alencar et al. 2005, Pinto 2000).

A própolis marrom do Estado do Ceará originou-se de uma flora rica em *Anadenanthera colubrina* (angico), *Hyptis suaveolens* (bamburral) e *Croton sonderianus* (marmeleiro). No nordeste brasileiro o marmeleiro é o principal arbusto da caatinga (CARVALHO et al., 2001). Segundo TRIGUEIRO et. al. (2009), o angico apresenta maior

frequência relativa e absoluta seguida da espécie marmeleiro na flora da caatinga. O bamburral também foi mencionado por AIRES e FREITAS (2001), como um dos vegetais mais frequentemente visitados pelas abelhas *Apis mellifera*. A própolis marrom do Estado de Pernambuco originou-se da flora contendo *Croton sonderianus* (marmeleiro), *Macrosiphonia velame* (velame-branco), *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret (jurema ou espinheiro preto) e *Caesalpinia pyramidalis* Tul, (catingueira). O velame-branco é nativo do cerrado, sendo utilizado como recurso medicinal pela população local (GUARIM-NETO e MORAIS 2003). Suas folhas e ramos são usados contra doenças venéreas, gastrites, queimaduras e úlceras (VILA-VERDE et al., 2003, MACEDO e FERREIRA 2004). A jurema ou espinheiro preto é uma árvore muito conhecida no nordeste brasileiro. É utilizada na medicina caseira em tratamentos de queimaduras, acne e problemas de pele (MAIA, 2004), e possui propriedades antimicrobianas (RODRIGUES, 1996). A catingueira, assim denominada por ser característica da caatinga, apresenta atividade antifúngica e antimicrobiana (CRUZ et al., 2007; GUERRA & NODARI, 2001).

5. Conclusões

Concluimos que pelo melhor resultado comprovado estatisticamente da própolis verde, nos faz testá-la futuramente como antimicrobiano natural a ser adicionado em rações para peixes. As própolis marrons dos Estados do Ceará e de Pernambuco precisam de novos testes para verificar seu potencial antimicrobiano em concentrações maiores. Nas condições do presente estudo, os extratos etanólicos das três própolis avaliadas mostraram somente efeito bacteriostático contra os isolados de *Aeromonas* spp.

6. Agradecimentos

À colega de trabalho Cláudia Barreto, a professora Eva Sarmento e a Associação dos Criadores de Abelha do Município de Petrolina (ASCAMP) pelas doações das própolis brutas.

7. Referências bibliográficas

- Aires, E.R.B. & Freitas, B.M. 2001. Caracterização palinológica de algumas amostras de mel do estado do Ceará. *Ciência Agronômica*. v. 32, n. 1/2.
- Akinbowale O.L., Peng H. & Barton M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*. 100:1103-1113.
- Alencar S.M., Aguiar C.L. , Paredes-Guzmán J. & Park Y.K. 2005. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Cienc. Rural*. 35:4.
- Azza M.M. Abd-El-Rhman. 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 27:454–459.
- Banskota A.H., Tezuka Y., Adnyana I.K., Midorikawa K., Matsushige K., Message D., Huertas A.A.G. & Kadota S. 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacology, Limerick*. 72:239-246.
- Barja J.L. & Esteves A.T. 1988. Enfermidades bacterianas. In: *Patologia acuícultura*. Espanha: Caicyt. 550p.

- Bianchini L., & Bedendo I.P. 1998. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Sci. Agric.* 55:1.
- Brasil. Instrução Normativa n.3 de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis.
- Cabello F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology.* 8:1137-44.
- Carvalho, F.C.; Filho, J.A.A.; Garcia R. & Filho J.M.P.; Albuquerque V.M. 2001. Efeito do Corte da Parte Aérea na Sobrevivência do Marmeleiro (*Croton Sonderianus* Muell.Arg.). *Revista Brasileira de Zootecnia.* 30 n. 3, p. 930-934.
- CLSI, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Approved standard M100-S17, 17th, ed. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa. Acesso em: <http://www.clsi.org/>
- Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V. & Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. 2006 *Journal of Ethnopharmacology*, 106:290-302.
- Costa A.B. 2003. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Piracicaba, SP: USP, 54p. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de Concentração Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo.
- Cruz, M.C.S.; Santos, P.O.; Barbosa, Jr., A.M.; Mélo, D.L.F.M.; Alviano, C.S.; Antonioli, A.R.; Alviano, D.S. & Trindade, R.C. 2007. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of Ethnopharmacology* v. 111, p. 409-412.

- Cueto D.J. 1989. Experiência clínica de los medicamentos elaborados com propoleo. *In*: ASIS, M., Investigaciones cubanas sobre el propoleo: Memórias del 1º Simpósio sobre los efectos del propoleo em la salud humana y animal. 1988. Varadero. Matanzas: Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinária, Cuba. 259-262.
- Franco S.S., Rosa A.P., Lengler S., Uttpatel R., Zanella I., Gressler C. & Souza H.M. 2007. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. *Ciência Rural*. 37:1765-1771.
- Garcia R.C., Sá M.E.P., Langoni H. & Funari S.R.C. 2004a. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida in vitro* e em coelhos. *Acta Scientiarum Animal Sciences*. Maringá. 26:69-77.
- Garcia R.C., Sá M.E.P., Langoni H. & Funari S.R.C. 2004b. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. *Acta Scientiarum Animal Sciences*. 26:57-67.
- Guarim-Neto, G. & Morais, R.G. 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica* v.17 p. 561-584.
- Guerra, M.P. & Nodari, R.O. 2001. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. *In*: SIMÕES, CMO, et al. (Orgs.). *Farmacognosia da planta medicinal*. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS –UFSC p. 13-26.
- Hadacek F. & Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay of choice. *Phytochem Anal*, 11:137-147.
- Hawley J.S., Murray C.K. & Jorgensen J.H. 2008. Colistin Heteroresistance in *Acinetobacter* and Its Association with Previous Colistin Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52:351–352.

- Kujungiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R. & Popov S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol, Limerick*. 64:235 – 240.
- Loguercio A.P., Groff A.C.M., Pedrozzo A.F., Witt N.M., Silva M. S. & Vargas A.C. 2006. Atividade in vitro do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. *Pesq. Agropec. Bras.* 41:347-349.
- Macedo, M. & Ferreira, A.R. 2004. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 14, n. 1, p. 40-44.
- Maia, G.N. 2004. Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z. p. 237-246.
- Marcucci M.C., Ferreres F., García-Viguera C., Bankova V.S., De Castro S. L., Dantas A. P., Valente P. H. M. & Paulino N. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol, Limerick*. 74:105-112.
- Mirzoeva O.K., Grishanin R.N. & Calder P.C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research*. 152:239-246.
- Morand B., Muhlemann K. 2007. Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:14098-14103.
- Orsi R.O., Sforcin J.M., Funari S.R.C., Fernandes-Jr. A. Rodrigues P. & Bankova V. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on Salmonella serovars. 2007. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, 13:748-757.
- Park, Y.K., Alencar, S.M., Scamparini, A.R.P. & Aguiar, C.L. 2002. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, v. 2, p. 997-1003.

- Pinto M.S. 2000. Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite. Viçosa MG: UFV, 2000. 104p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Federal de Viçosa.
- Plumb J.A. 1994. Health maintenance of cultured fishes. Principal microbial diseases. USA: CRC. 254p.
- Rodrigues, R.R. 1996. (Coord.). Trilhas do parque da ESALQ: árvores medicinais. 1996. Piracicaba: ESALQ, 28p.
- Saavedra M.J., Guedes-Novais S., Alves A., Rema P., Tacão M., Correia A. & Martinez-Murcia A. 2004. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Aeromonas hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). International Microbiology. 7:207-211.
- Sforcin J.M., Fernandes Jr A., Lopes C.A.M., Bankova V. & Funari S.R.C. 2000. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. J Ethnopharmacol, Limerick. 73:234-249.
- Schwaber M.J., Raney P.M., Rasheed J. K., Biddle J.W. Williams P., McGowan, Jr J.E., & Tenover F.C. 2003. Utility of NCCLS Guidelines for Identifying Extended-Spectrum β -Lactamases in Non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae* Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2004, p. 294–298.
- Trigueiro, E.R.C.; Oliveira, V.P.V. & Bezerra, C.L.F. 2009. Indicadores biofísicos e a dinâmica da degradação/desertificação no bioma caatinga: estudo de caso no município de Tauá, Ceará. Revista Eletrônica do Prodepa, Fortaleza, v. 3, n. 1, p. 62-82.
- Tsukamoto R.Y. & Takahashi N.S. 1992. Falta de proteína para ração: estrangulamento da aqüicultura no Brasil. Panor. Aquicult., nov./dez., p. 8-9.

- Vargas A.C., Loguercio A.P., Witt N. M., Costa M.M., Silva M.S. & Viana L.R. 2004. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural* 34:159-163.
- Verschuere L., Rombaut G. & Sorgeloos P. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64:655-671.
- Vila-Verde, G.M., Paula, J.R. & Caneiro, D.M. 2003. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 64-66.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. 4th Ed. 663p. + Ap.

CONCLUSÕES GERAIS

- As amostras de própolis estudadas exerceram efeito antimicrobiano bacteriostático, através dos extratos etanólicos, sobre os 15 isolados de *Aeromonas* spp. testados.
- Isolados diferentes de *Aeromonas* spp. variaram quanto à sensibilidade à própolis.
- A padronização dos extratos de própolis de cada região permitiria garantir a qualidade, eficácia e segurança para sua utilização em produtos terapêuticos.