



## ARTIGO CIENTÍFICO

### Potencial antibiótico da própolis apícola Potiguar em bactérias de importância veterinária

#### *Antibiotic potential of the Potiguar bee propolis on the bacteria of veterinary importance*

Daniel Santiago Pereira<sup>1</sup>; Maria Rociene Abrantes<sup>2</sup>; Wesley Adson Costa Coelho<sup>2</sup>; Marinalva Oliveira Freitas<sup>3</sup>; Carlos Iberê Alves Freitas<sup>4</sup>; Jean Berg Alves da Silva<sup>4</sup>.

**Resumo:** A Própolis de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) é um produto da colmeia, elaborado a partir de exsudações de resinas que as abelhas recolhem de determinadas plantas. A composição química da própolis é complexa e relacionada à diversidade vegetal encontrada em torno da colmeia. Estudos recentes demonstram que a própolis possui uma série de propriedades biológicas, essas propriedades têm feito da própolis uma importante matéria-prima para as indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. O estudo dessas propriedades é, portanto, necessário, a fim de se obter um produto com alto padrão de qualidade e valor agregado. Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de sete extratos alcoólicos da própolis (EAP) apícola Potiguar no desenvolvimento de quatro microrganismos de importância veterinária. As colmeias habitadas com enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) selecionados para coleta da própolis estavam organizadas em apiários, distribuídos em região de vegetação distinta no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. As coletas de material no campo ocorreram no período dos meses de outubro a dezembro de 2013, a obtenção dos extratos e os ensaios do potencial antibiótico ocorreram durante o ano de 2014. Foi identificado que os EAP 1, 6 e 7 foram ativos nos quatro microrganismos testados, e os EAP 3 e 4 não demonstraram-se ativos para nenhum microrganismo. Os resultados encontrados evidenciam a superioridade da própolis vermelha do mangue Potiguar quando comparados aos resultados citados em outros estudos para os mesmos microrganismos.

**Palavras Chave:** Extrato Alcoólico de Própolis; *Enterobacter aerogenes*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp.

**Abstract:** Propolis Africanized bees (*Apis mellifera* L.) is a product of the bee hive, elaborated based on exudates resins that bees collect from certain plants. The chemical composition of propolis is complex and related to plant diversity found around the bee hive. Recent studies have shown that propolis has a number of biological properties, these properties have made from propolis an important raw material for the pharmaceutical, food and cosmetic industries. The study of the properties is therefore necessary in order to obtain a product with a high standard of quality and value. This study aims to evaluate seven different alcoholic extracts of propolis (AEP), of Potiguar honey bees, in the development of four microorganisms of great veterinary importance. The bee hives inhabited by swarms of Africanized bees (*Apis mellifera* L.) selected for the collection of propolis were organized in apiary distributed in different vegetation region in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. The material collected in the field occurred in the period from October to December 2013, obtaining the extracts and antibiotic potential of the trials took place during the year 2014. It was identified that the EAP 1, 6 and 7 were active in all four tested microorganisms, and the EAP 3 and 4 are not demonstrated to be active for any microorganism. The results show the superiority of red propolis Potiguar of mangrove when compared to the results cited in other studies for the same microorganisms.

**Key words:** alcoholic extracts of propolis; *Enterobacter aerogenes*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp.

\*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 22/03/2016; aprovado em 23/07/2016

<sup>1</sup>Tec. Agrícola – Engº Agrônomo D.Sc., Pesquisador em Apicultura Sustentável – Embrapa Amazônia Oriental E-mail: [santiagoesam@gmail.com](mailto:santiagoesam@gmail.com);

<sup>2</sup>Médico Veterinário D. Sc.;

<sup>3</sup>Bacharel em Farmácia D.Sc., Professora – UFERSA;

<sup>4</sup>Médico Veterinário D. Sc., Professor – UFERSA.

## INTRODUÇÃO

A própolis trata-se de um material balsâmico, resinoso que pode ser extraído de flores, ramos, pólen, brotos e exsudatos das árvores gerado pelas abelhas e está sendo utilizada tanto na medicina humana quanto na veterinária para o tratamento de enfermidades (COELHO et al., 2010).

As investigações sobre as propriedades antibióticas da própolis têm sido conduzidas sobre tudo na área médica e veterinária, onde o produto tem demonstrado uma eficiente atividade bacteriostática e bactericida em relação a diversos gêneros de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BIANCHINI; BEDENDO, 1998).

Segundo Fischer (2008), a composição da própolis é extremamente complexa, mais de 300 substâncias diferentes já foram identificadas. Suas características constituintes podem variar de acordo com a espécie de abelhas e época do ano que é coletada. Ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, cetonas, flavonóides, proteínas, vitaminas, são os compostos da própolis destacando em alguns compostos a presença de flavonóides, grande responsável pelo sinergismo segundo Longhini (2007).

Possui ações antivirais, antiinflamatórias, antioxidantes, antiparasitárias e entre todas a mais importante é a antimicrobiana (FISCHER, 2008). O extrato etanólico de própolis tem efeito bactericida causado pela presença de ingredientes ativos, sugerindo que sua combinação com antimicrobianos possa permitir a redução da dose clínica de determinados antibióticos e, assim diminuir a incidência de efeitos colaterais e ao mesmo tempo potencializar a antibioticoterapia no tratamento de infecções em que a resistência bacteriana torna-se fator determinante.

No Brasil Fernandes Júnior et al., (2006) verificaram a variação da atividade do extrato alcoólico com própolis de diferentes regiões na eficácia inibitória frente a *S.aureus*, *Enterococcus* sp., *E.coli*, *P.aeruginosas* e *C. albicans*, tendo constatado interferência estatisticamente significativa para origem da própolis.

Este trabalho objetivou identificar o potencial inibitório dos extratos alcoólicos da própolis Potiguar no desenvolvimento *in vitro* de quatro microrganismos de importância veterinária.

## MATERIAL E MÉTODOS

As colmeias habitadas com enxames de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) selecionados para coleta da própolis estavam organizadas em apiários, distribuídos em região de vegetação distinta no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Sendo uma amostra obtida de apiário em Baraúna-RN, duas própolis oriundas de apiários do município de Extremoz-RN, duas de Punaú-RN, uma de Ceará-Mirim, e uma de Natal-RN. As coletas de material no campo ocorreram no período dos meses de outubro a dezembro de 2013, a obtenção dos extratos e os ensaios do potencial antibiótico ocorreram durante o ano de 2014.

De acordo com a classificação climática de Köppen (1918) apud BNB (1969), a região de coleta da própolis apresentam Clima Tropical Chuvoso (As'), caracterizado por apresentar verão seco e temperatura média mensal acima de 18°C em todos os meses do ano.

O método de coleta da própolis consistiu da utilização do CPI (coletor de própolis inteligente) acopladas às paredes laterais de colméias do tipo *Langstroth*. Após separação de impurezas, cada amostra foi acondicionada em recipiente fechado, ao abrigo da luz e sob refrigeração abaixo de 0°C.

### Preparo dos Extratos

Pesaram-se 30 gramas de cada uma das amostras, que foram trituradas, conduzida a Erlenmeyer e acrescida de 100 mililitros de álcool cereal 96%, dispostas individualmente em agitador magnético por 5 dias. Após este período o extrato foi filtrado em papel filtro nº 3, a parte líquida conduzida à refrigeração e à pasta remanescente foi acrescida 100 ml de álcool cereal para obtenção de 07 soluções teste.

Este processo repetiu-se por mais duas vezes, e os filtrados reunidos considerando sua origem. Após refrigeração a 0 °C por setenta e duas (72) horas, os extratos foram filtrados em papel filtro número 02 para retirada de ceras, a remoção dos solventes dos extratos foi realizada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperatura entre 40° e 50°C por um período de até uma hora.

Realizado todo o processo, os extratos foram conduzidos à capela em exaustão para que fossem retirados os resíduos dos solventes até a obtenção da parte sólida. Em seguida foi coletado 1 grama de cada uma das amostras e adicionado 100 ml de uma solução hidroetanólica 80%, para obter a concentração de 1% ou 10.000 ppm.

### Avaliação da atividade antibacteriana in vitro

As cepas bacterianas utilizadas foram *Enterobacter aerogenes* (ATCC 1304), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* (ATCC xxxx) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) provenientes de coleções padronizadas *American Type Cell Culture* (ATCC), devidamente caracterizadas morfológicamente, fisiologicamente e bioquimicamente. Os inóculos foram reativadas utilizando-se caldo Brain Heart Infusion estéril para obter turvação do líquido equivalente ao grau de turvação da solução padrão de 0,5 da escala Mac Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL), de acordo com CLSI (2011).

Para avaliação da atividade antibacteriana foi realizada a técnica de difusão em em ágar Mueller Hinton (AMH) pela técnica de perfuração com modificações (GROOVE D.C.; RANDALL, 1955). Esta técnica foi conduzida da seguinte maneira: em placas contendo 30 mL ágar Mueller Hinton, foram perfurados poços de 6 mm de diâmetro com auxílio de ponteira estéril. Para evitar o contato das amostras com a placa de Petri após a retirada do molde da ponteira, foi posta uma gota do mesmo ágar finalizando a confecção do poço.

Com auxílio de swabs esterilizados, a suspensão foi inoculada nas placas de AMH, em todas as direções (CLSI, 2011). Aos poços, foi então adicionado 40µL das diferentes concentrações do extrato. As placas foram deixadas em repouso até a completa absorção do extrato pelo ágar. Em seguida, foram incubadas de forma invertida, a 37°C, por 24 horas em estufa. O experimento foi realizado em triplicata, e a atividade antimicrobiana foi considerada positiva quando houve desenvolvimento de halo de inibição circundando o poço contendo as diferentes concentrações do extrato. Mediuse em milímetros o halo de inibição do crescimento, utilizando paquímetro com auxílio de lupa (CLSI, 2011). Como controle positivo empregou-se discos do antibiótico

Norfloxacin (10 mg) para placas inoculados com *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* e Doxiciclina (30 mg) para *Staphylococcus aureus*, e como negativo, 40µL de álcool Cereal.

### Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão através do programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) versão 6.0.

Para evidenciar diferenças de aros de crescimento entre os diferentes tipos de própolis utilizou-se, após verificação dos pressupostos paramétricos, Anova não paramétrica Kruskal-Wallis seguido Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 07 extratos, sendo que duas amostras de Punaú-RN e uma de Baraúna-RN foram

provenientes de área com vegetação de Caatinga. A própolis de Baraúna-RN foi obtida em apiário com predominância de planta conhecida como jurema preta (*Mimosa tenuiflora*).

De acordo com Tabarelli et al. (2006), as própolis de Extremoz-RN, foram obtidos de apiários instalados em formação vegetal de Restinga, enquanto que a própolis obtida em apiário no município de Ceará Mirim-RN estava instalado em ambiente de vegetação com predominância de Mata Atlântica.

A própolis com origem no município de Natal-RN foi obtida de apiário instalado em ambiente de vegetação denominada Mangue, com predominância vegetal de planta típica da região conhecida popularmente por rabo-de-bugiu, (*Dalbergia ecastophyllum*), cujo látex apresenta-se com coloração vermelha (TABELA 01). Dausch et al., (2006) em estudo em que analisaram comparativamente exudatos das plantas e da própolis vermelha, identificaram que o perfil cromatográfico da própolis é exatamente o mesmo da *D. ecastophyllum*.

**Tabela 1** – Apresentação das amostras de própolis bruta, sua origem, identificando a coloração aproximada da própolis bruta e a obtida em cada um de seus extratos alcoólicos (EAP).

| PROPOLIS –<br>Origem / Domínio Vegetal | Coloração – Própolis Bruta | Coloração EAP     |
|----------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| 1-Baraúna-RN (Caatinga)                | Verde                      | Verde escuro      |
| 2-Extremoz-RN (Restinga)               | Verde                      | Marrom esverdeado |
| 3-Extremoz-RN (Restinga)               | Marrom                     | Amarelo           |
| 4-Punaú-RN (Caatinga)                  | Preto                      | Castanho          |
| 5-Punaú-RN (Caatinga)                  | Marrom                     | Amarelo           |
| 6-Ceará-Mirim-RN (Mata Atlântica)      | Vermelho - Marrom          | Marrom            |
| 7-Natal-RN (Mangue)                    | Vermelho                   | Vermelho          |

A atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos da própolis bruta (EAP) do nordeste brasileiro na concentração de 1% mostrou-se distinta para cada um dos

microrganismos avaliados, e, alguns extratos apresentaram-se ativos para todos os microrganismos testados (Tabela 02).

**Tabela 2.** Resultados dos extratos alcoólicos de própolis (EAP) do nordeste brasileiro, na concentração de 1%, apresentando a sensibilidade nos microrganismos testados através do diâmetro do halo de inibição em mm.

| PRÓPOLIS     | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Salmonella spp</i> |
|--------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 1            | 11 ± 1 ab                     | 14 ± 2 abc              | 15 ± 4b                      | 14 ± 3ab              |
| 2            | -                             | 23 ± 24 ab              | -                            | 12 ± 2b               |
| 3            | -                             | 3 ± 2 c                 | 3 ± 5c                       | 5 ± 4c                |
| 4            | -                             | 5 ± 10 c                | -                            | -                     |
| 5            | -                             | 12 ± 2 bc               | 2 ± 3c                       | 3 ± 5c                |
| 6            | 7 ± 6 b                       | 14 ± 4abc               | 19 ± 8ab                     | 11 ± 2b               |
| 7            | 36 ± 47 <sup>a</sup>          | 23 ± 4ab                | 13 ± 11b                     | 15 ± 3ab              |
| Controle (+) | 23,6 ± 4 <sup>a</sup>         | 24,0 ± 6a               | 24 ± 1a                      | 18 ± 3a               |
| Controle (-) | -                             | -                       | -                            | -                     |

<sup>a,b,c,d</sup> Letras seguidas diferentes na coluna significa diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Somente os EAP 3 e 4 não mostraram-se ativos para nenhuma das bactérias testadas, o EAP 5 mostrou-se ativo somente para *E. coli*, o EAP 2 apresentou-se ativo para *E. coli* e *Salmonella*, e os EAP 1,6 e 7, demonstraram-se ativos para todos os microrganismos testados.

De modo geral, um extrato é considerado ativo contra bactérias e fungos quando a zona de inibição for maior do que 6mm (MUHAMMAD; MUHAMMAD, 2005).

O controle positivo com o antibiótico Norfloxacin (10 mg) apresentou atividade antibacteriana nos inoculados com *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, enquanto que o antibiótico Doxiciclina apresentou-se

atividade para *Staphylococcus aureus*. O controle Negativo apresentou que o álcool cereal não demonstrou interferência na ação antibiótica dos bioativos dos Extratos Alcoólicos das Própolis (EAP), provando que os efeitos ora obtidos no presente trabalho com os EAP, provém de reação dos microrganismos aos bioativos presentes nas própolis.

### *Enterobacter aerogenes*

Realizado os testes de média foi identificado que a bactéria *Enterobacter aerogenes* submetida a tratamentos na concentração média de 1% dos EAP apresentou resultados inibitórios maiores no EAP 7 (própolis vermelha potiguar),

com 36 mm do halo de inibição, apesar disso foi estatisticamente similar na comparação das médias com o tratamento controle utilizando o antibiótico Norfloxacin (10 mg), e ambos foram superiores a todos os demais tratamentos. O EAP 1, cujo a própolis foi oriunda de Baraúna-RN, apresentou-se estatisticamente igual e inferior ao produto comercial e ao EAP 7, apresentando halo de inibição com 11mm, que por sua vez, foi estatisticamente igual e superior ao EAP 6. Os demais extratos não apresentaram halo de inibição.

Kalogeropoulo et al., (2009), verificaram os efeitos de 12 EEP obtidas de regiões distintas da Grécia na concentração de 5% e identificaram que somente duas amostras apresentaram concentração mínima inibitória, o restante apresentou efeito nulo sobre a bactéria.

Orozco et al., (2010), identificaram que extratos etanólicos de própolis (EEP) do México não apresentaram inibição sobre a bactéria Gram-negativa *Enterobacter aerogenes*. No entanto, Hendi, Naher, e Al-Charrakh, (2011), estudando EEP da própolis Iraquiana, encontraram efeitos inibitórios com halo de inibição de 10mm na concentração de 10%, e constataram que o halo aumentou a medida que houve o aumento da concentração.

Al-Abbadi et al., (2015), avaliando o efeito de própolis da Jordânia em comparação com amostras da China e da Turquia, identificou que os EEP na concentração de 30%, apresentaram halo de inibição estatisticamente superior aos demais, com diâmetro de 26,3mm contra *E. aerogenes*.

Aga et al. (1994), apresentou que o ácido hidroxicinâmico, isolado e identificado em própolis brasileiras, demonstrou atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, e *Arthroderma benhamiae*.

Os resultados encontrados para a bactéria Gram-negativa *Enterobacter aerogenes* nos mostraram a existência de atividade antibacteriana somente em três EAP (1, 6, e 7), os demais apresentaram efeito nulo para a respectiva bactéria. Isto pode indicar que os compostos bioativos na concentração de 1% não são suficientes para apresentar seus efeitos contra este microrganismo, ou não existem. Apesar disto, vale ressaltar que quando comparado a outros trabalhos, pode-se constatar que os resultados aqui apresentados são superiores, uma vez que as partes destes não demonstraram qualquer efeito, ou, quando apresentaram, as concentrações citadas pelos autores foram de 5 a 30 vezes maiores. Mesmo assim, o diâmetro do halo de inibição encontrado nos trabalhos utilizando-se extratos de própolis, apresentaram-se inferiores quando comparados com o alcançado pelo EAP 7 (própolis vermelha potiguar).

Tendo em vista o mecanismo da atividade antimicrobiana da própolis, a literatura relata que tal efeito é complexo e atribuído principalmente à presença de compostos fenólicos, bem como ao possível sinergismo entre compostos presentes no extrato da própolis (MARCUCCI et al., 2001; JORGE et al., 2008).

Tal atividade é bem compreendida, já que as abelhas coletam a própolis principalmente para prevenir a decomposição de insetos e outros organismos que foram mortos por elas próprias após uma invasão na colmeia. Assim, desde o início das pesquisas com a própolis, vários pesquisadores têm estudado suas propriedades antimicrobianas (SILVA FILHO et al., 2008; JORGE et al., 2008).

Desse modo, pode-se afirmar que para a bactéria *E. aerogenes*, a própolis vermelha potiguar demonstrou ser mais eficiente, e em uma menor concentração, quando comparada aos demais trabalhos.

### ***Escherichia coli***

Verificados os resultados constatou-se que todos os EAP apresentaram halo de inibição, porém somente cinco extratos foram considerados ativos, com halos superiores a 6 mm. Avaliando-se estatisticamente os efeitos inibitórios no halo de desenvolvimento da bactéria *E. coli* causados pelos extratos das própolis, verificou-se que os EAP 7 e 2, da própolis vermelha do mangue oriunda de Natal-RN e, da própolis verde de área de restinga no município de Extremoz-RN, ambos com halo de inibição média de 23mm, foram estatisticamente semelhantes ao tratamento controle, e estatisticamente iguais aos EAP 1 e 6, e, ao mesmo tempo, superiores a todos os tratamentos. Os EAP 1 e 6, ambos com halo médio de 14 mm, apresentaram-se estatisticamente iguais e inferiores ao tratamento controle e aos EAP 7 e 2, porém superiores aos EAP 3, 4 e 5. O EAP 5 (12mm), demonstrou ser estatisticamente igual e superior aos EAP 3 e 4.

Souza et al. (2014), avaliando própolis derivada das plantas *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* e *Eucalyptus citriodora*, obtida em apiário experimental na UNESP de Botucatu-SP durante as quatro estações do ano, encontraram efeito inibitório a partir de extratos etanólicos de própolis (EEP) em uma concentração de 30%, com halo de inibição variando entre 4,3 a 8,2mm para a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Noori et al. (2012), em seu estudo avaliando EEP na concentração de 4,5% em *E. coli*, encontraram que os extratos oriundos da Arábia Saudita apresentaram halo inibitório de 15mm, enquanto que o EEP do Egito apresentaram halo de 25mm. Erturk et al. (2014), encontraram halo de 16mm na concentração máxima de 4% em EEP da Turquia, enquanto que Niculae et al. (2015) encontraram halo de inibitório variando entre 16,5 a 25mm em EEP 4% a partir de própolis da Romênia.

Quanto à ação antimicrobiana da própolis, destaca-se sua eficiente ação inibidora, *in vitro*, sobre várias linhagens de bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, e limitada ação contra bactérias Gram-negativas, como *E. coli* (SFORCIN et al., 2000). Porém, neste trabalho, apesar de dois EAP não serem considerados ativos, a cepa de *E. coli* (ATCC 25922) quando visualizada comparando aos resultados de todos os EAP testados nos microrganismos, identificou-se que foi o único a demonstrar halo de inibição em todos os EAP.

Meresta et al., (1989) estudou o tratamento de mastite com extrato de própolis e obtiveram recuperação completa em 86,6% das vacas com mastite aguda e de 85% por *E. coli*, 91% por *Staphylococcus* sp. e de 84,3% por *Streptococcus* sp. mostrando que a própolis apresentou-se bastante eficaz na terapia de mastite causada por microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais.

Em um estudo sobre a própolis brasileira, foi identificado que a sazonalidade influencia na atividade antibacteriana da própolis produzida nas regiões sudeste e nordeste do Brasil (CASTRO et al., 2007). Os autores indicam que a composição da própolis pode ser alterada em

função da presença maior ou menor de compostos bioativos dos vegetais que podem variar durante as estações do ano (EREMIA; DABIJA, 2007).

Pode-se então constatar que alguns dos EAP estudados na concentração testada em *E. coli*, demonstraram efeito superior ao encontrado na literatura citada, pois onde se evidenciou halos de inibição superiores aos encontrados a concentração adotada foi a partir de 4 vezes a utilizada para os EAP da própolis nordestina, sendo que destes, a própolis vermelha do manguê, e a verde de área de restinga foram as que apresentaram melhor efeito do EAP frente aos demais extratos testados.

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com o relatado por Portilho et al., (2013), os autores relataram que das amostras de própolis testadas, observou-se um maior efeito inibitório da bactéria Gram-negativa *E. coli*, enquanto que para a gram-positiva *S. aureus* não houve grande capacidade de inibição.

### ***Staphylococcus aureus***

Quando os extratos foram testados sobre *Staphylococcus aureus* constatou-se que o EAP 6, própolis avermelhada do município de Ceará-Mirim/RN, apresentou halo de inibição de 19,0mm, foi estatisticamente igual e inferior ao tratamento controle, sendo estatisticamente igual e superior aos EAP 1 e 7. Os EAP 3 e 5 foram estatisticamente inferiores, e os EAP 2 e 4 foram nulos. Ou seja, das 7 amostras avaliadas somente 3 demonstraram-se ativas, com halo de inibição superior a 6 mm, EAP 6, seguido pelo EAP 1 e 7.

Portilho et al., (2013), utilizando onze extratos etanólicos de própolis (EEP) do Tocantins, em uma concentração aproximada de 30%, encontrou halos de inibição de 10 a 11mm em três EEP.

Souza et al., (2014), avaliaram EEP obtida a partir da própolis produzida em apiário no município de Botucatu-SP durante as quatro estações do ano, dentre estas a própolis verde, onde encontraram efeito a partir de uma concentração de 30% do EEP, com halo de inibição variando entre 8,3 a 14,3mm para a bactéria gram-positiva *S. aureus*.

Resultados positivos também foram encontrados por SAEKI et al., (2011), em que o extrato alcoólico de própolis (EAP) a 30% foi eficaz contra *S. aureus* proveniente de animais portadores de mastite, apresentando um halo de inibição entre 6 –18 mm, sugerindo como alternativa ao uso dos antibióticos comerciais.

Noori et al., (2012), em seu estudo avaliando EEP na concentração de 4,5% em *S. aureus*, encontraram que os extratos oriundos de própolis da Arábia Saudita e do Egito apresentaram halo inibitório de 15mm, muito similar ao relatado por Erturk et al., (2014), que encontraram halo de 14mm na concentração máxima de 4% em EEP da Turquia, porém, inferiores aos resultados encontrados no presente trabalho.

No entanto, considerando a afirmação de Muhammad, Muhammad (2005), somente os extratos dos tratamentos 2,3,4,5 não foram considerados ativos contra o microrganismo, sendo que os extratos 2 e 4 não apresentaram nenhum halo de inibição na concentração avaliada.

Estes resultados corroboram em parte com Ribeiro et al., (2015), que encontraram efeito nulo de extratos de própolis para *S. aureus*. De acordo com Gomes et al., (2016) e Garza-González (2010), as bactérias do gênero

*Staphylococcus* apresentam maior resistência ao extrato de própolis, uma vez que bactérias deste gênero possuem maior habilidade em desenvolver resistência a compostos em geral, sendo utilizada como um microrganismo de referência em testes de resistência.

De Moura Oliveira et al., (2012), em seu estudo analisando três amostras de EAP comercializadas no município de Barra do Garças-MT, nas concentrações de 5,10,15,20 e 30%, encontraram halo de inibição entre 1 e 4mm, sendo que de forma geral, os extratos de própolis não inibiram o crescimento de *S. aureus*.

Ao analisar a atividade antibacteriana de extratos de própolis sobre *S. aureus*, Park et al., (1998) observaram que apenas concentrações acima de 30% de própolis começaram a apresentar uma ligeira atividade (zona de inibição de 5 mm), e quando utilizados extratos de 60 e 80%, a inibição do crescimento microbiano aumentou consideravelmente (zona de inibição de 15 mm).

Por outro lado, Gomes et al., (2016) afirmou que bactérias de procedência bovinas e caninas apresentaram maior resistência, provavelmente pelo histórico de tratamento destes animais, marcado pelo uso indiscriminado de antimicrobiano, acarretando seleção de populações bacterianas mais resistentes.

Considerando a baixa concentração utilizada em todos os tratamentos, os resultados aqui encontrados concordam em parte com o relatado por Stepanović et al., (2003), onde afirmam que independentemente da resistência microbiana aos antibióticos, o extrato de própolis 20% mostra significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, enquanto as bactérias Gram-negativas são menos suscetíveis. Apesar disso, no presente estudo, se encontrou significativa atividade antimicrobiana em *S. aureus* utilizando somente a concentração de 1% (m/v) dos EAP das própolis Potiguares.

Estes resultados apresentam importância científica, já que de acordo com Fernandes Junior et al., (2006), a atividade antibacteriana de própolis produzidas em três regiões diferentes do Brasil (SP, RN e SC) testadas em *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrou que é maior para bactérias Gram-positivas. Diferente do que aqui foi encontrado, já que a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, apresentou halo de inibição, sob efeito dos EAP do Rio Grande do Norte, menor do que o que encontrou-se para as bactérias Gram-negativas *E. aerogenes* e *E. coli*.

Outra hipótese para alguns resultados divergentes, além da concentração utilizada no presente trabalho ser muito menor do que a utilizada na maioria dos demais estudos relatados, seria a diferença na composição que a própolis poderia vir a ter devido a fatores climáticos, ambientais e sazonais (PACKER, 2007).

Costa et al., (2013), encontraram que no estado da Bahia, própolis coletadas em diferentes estações do ano, quanto à atividade antibacteriana contra *S. aureus*, demonstraram alta atividade antimicrobiana, o que poderia estar relacionado principalmente às compostos fenólicos encontrados em regiões tropicais.

Os resultados aqui encontrados são inéditos para própolis Nordestina no tratamento de *S. aureus*, mesmo considerando que os efeitos de EAP são maiores em Gram-positivos, quando verificado as concentrações empregadas em outros estudos, foi possível obter um halo de inibição médio

de 19mm, superior à muitos outros resultados que só puderam ser alcançados em concentrações de até 20 a 30 vezes maiores.

### **Salmonella spp**

Verificados os efeitos médios dos extratos de própolis sobre *Salmonella* spp foi identificado que o extrato da própolis vermelha do manguê potiguar, EAP 7, e da própolis de coloração verde da Caatinga, EAP 1, foram iguais estatisticamente e superiores aos EAP 2 e 6, e superiores aos EAP 3, 4 e 5, sendo que o EAP 4 apresentou efeito nulo.

De Moura Oliveira et al., (2012), em seu estudo analisando três amostras de EAP comercializadas no município de Barra do Garças-MT, em concentrações de 5 a 30%, encontraram halo de inibição entre 0,2 a 1,5mm, sendo que de forma geral, os extratos de própolis não inibiram o crescimento de *Salmonella typhimurium*.

Para Sinhorini et al., (2014), das espécies bacterianas sensíveis à ação inibitória da própolis, cada espécie possui uma concentração, que determina a eficiência do produto. O referido autor relatou que bactérias Gram-positivas, mostram sensibilidade em concentrações a partir de 0,1%. Já em Gram-negativas, observa-se sensibilidade bacteriana somente em concentrações mais elevadas, a partir de 3%.

Valdes et al., (1989), observaram que o extrato de própolis apresentou efeito antibiótico que foi notado sobre bactérias Gram-negativas como a *Salmonella*. Enquanto que Vargas et al., (2004) encontraram sensibilidade em 42,5% das bactérias Gram-negativas testadas ao extrato etanólico de própolis (EEP) a 50%.

Heimbach et al., (2016), encontraram que resíduos da extração hidroalcoólica de própolis verde e marrom atuaram como inibidores de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Klebsiella*. Os autores indicaram o subproduto para complementação em ração animal.

Um estudo realizado por Orsi et al., (2005), comparou a atividade antibacteriana da própolis de duas regiões do Brasil (SC e RN) contra *Salmonella* e verificou-se que a própolis do nordeste do Brasil é mais eficiente que a do Sul, concluindo que a atividade contra bactérias Gram-negativas pode variar de acordo com a região geográfica de coleta da própolis. No entanto a bactéria só foi inibida pela própolis com a concentração mais elevada (10,0%), mostrando que a ação da própolis é limitada em bactérias Gram-negativas, porém é possível sua utilização como uma alternativa de controle de infecção por salmonelas.

De acordo com Hogue et al., (1997), dentre as principais doenças que acometem as aves, a salmonela trata-se de um gênero bacteriano dos mais estudados microbiologicamente. São microrganismos capazes de provocar enfermidades em seres humanos e animais. Salmonelose aviária designa doenças agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella*.

DE Carvalho et al., (2013), em seu estudo sobre o uso de EAP como revestimento de ovos de galináceos, permite que a qualidade dos mesmos seja mantida em níveis adequados para o consumo por mais de 42 dias de armazenamento em temperatura ambiente, informa que estes apresentaram ausência de *Salmonella*, sendo que os valores encontrados para a análise microbiológica dos ovos tratados com própolis foram inferiores ao estabelecido na legislação.

No entanto Buriol et al., (2009), verificaram que o extrato de própolis obtido com etanol 70% v/v apresentou atividade contra todas as linhagens testadas, com exceção de *Salmonella typhimurium*. Para esta bactéria não se observou inibição do crescimento com nenhum dos extratos testados.

Stepanović et al., (2003), ao estudar 13 amostras de própolis da Servia, identificou que as *Salmonella* spp apresentaram-se como as bactérias Gram-negativas mais resistentes aos efeitos do EAP, demonstrando resultados inibitórios somente a partir da concentração de 5%. O referido autor sugere que outros estudos com compostos isolados seriam importantes para melhor compreensão deste produto e suas propriedades biológicas, pois a atividade antibacteriana da própolis contra as bactérias Gram-negativas podem variar de acordo com a região geográfica onde a própolis foi produzida.

No entanto, Pereira et al., (2015), afirma que os efeitos dos extratos de própolis são frequentemente percorridos de forma individualizada de alguns de seus constituintes principais, fato que pode provocar distorções nos resultados, já que, sabendo que a própolis provem de uma mistura de diferentes componentes, em distintas proporções, geralmente não se sabe como esses constituintes interagem e promovem seus efeitos sobre outros organismos. Adicionalmente, há considerável variação na composição dos extratos das própolis produzidas a partir de certas espécies de plantas e do período do ano, de modo geral, variam de acordo com as condições edafoclimáticas que caracterizam a flora de uma região.

### **CONCLUSÕES**

O Extrato Alcoólico da Própolis vermelha do manguê Potiguar, EAP 7, foi ativo em todos os microrganismos sendo o melhor EAP para a bactéria Gram-negativa *Enterobacter aerogenes*, apresentando-se estatisticamente igual e inferior ao tratamento controle em *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., e inferior somente em *Staphylococcus aureus*;

O EAP 6, da própolis marrom-avermelhada de área de Mata-Atlântica, foi ativo em todos os microrganismos apresentando efeito antibiótico estatisticamente semelhante ao tratamento controle na bactéria Gram-positiva *S. aureus*;

O EAP 1, da própolis verde de área de Caatinga de Barauna-RN, foi ativo em todos os microrganismos;

Os EAP 1 e 7 apresentaram efeito antibiótico estatisticamente equivalente ao tratamento controle na bactéria *Salmonella* spp., e os EAP 2 e 7 foram correspondentes ao tratamento controle em *E. coli*;

Foi evidenciado que houve diferença na atividade antimicrobiana dos EAP de biomas distintos nas bactérias testadas, verificando-se maior susceptibilidade da *E. coli*, e menor em *E. aerogenes* com quatro extratos sem efeito.

### **AGRADECIMENTOS**

Aos apicultores Potiguares Célio Lino Andrade e Joaz Ferreira, que contribuíram para a obtenção deste trabalho com o fornecimento do produto básico para estes estudos, as própolis.

## REFERÊNCIAS

- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S.. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 945-946. 1994.
- AL-ABBADI, A. A.; GHABEISH, I. H.; ATEYYAT, M. A.; HAWARI, A. D.; ARAJ, S. E. A.. A Comparison between the Anti-microbial Activity of Native Propolis and the Anti-microbial Activity of Imported Ones against Different Health Microbes. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(1). 2015.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P.. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Sci. Agr.*, 55: 149-152. 1998.
- BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; DOS SANTOS, J. M.; ROSA, M. R. D.; QUINÁIA, S. P.; COSTA-LOTUFO, L. V.. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: An alternative to ethanolic extract. *Química Nova*, 32(2), 296-302. 2009.
- CASTRO, L. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, v. 30, n. 7, p. 1516-1516, 2007.
- COSTA, A. S., MACHADO, B. A. S., UMSZA-GUEZ, M. A., CIRQUEIRA, M. G., NUNES, S. B., & PADILHA, F. F.. Survey of studies with propolis produced in the state of Bahia, Brazil. *SITIETIBUS série Ciências Biológicas*, 13. 2013.
- CLSI; Publication M100-S21. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2011.
- DA SILVA FILHO, A.A.; SOUSA, J. P. B.; SOARES, S.; FURTADO, N. A. J. C.; ANDRADE E SILVA, M. L.; CUNHA, L. E. G.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K.. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, v.63, p.40-6, 2008.
- DAUGSCH A, MORAES CS, FORT P, PACHECO E, LIMA IB, ABREU JÁ, PARK, YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica, *Mensagem Doce*, 2006, nº 89, disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>>. Acesso em junho de 2016.
- DE CARVALHO, J. X.; OJEDA SUÁREZ, R.; MENDES, F. Q.; FERNANDES, R. D. B.; DA CUNHA, M. C.; DE CARVALHO, A. M. X.. Increased shelf life of eggs through the use of propolis. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)*, 34(5), 2287-2296. 2013.
- DE MOURA OLIVEIRA, K. A.; DE OLIVEIRA, G. V.; BATALINI, C.; ROSALEM, J. A.; RIBEIRO, L. S.. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 33(2), 211-222. 2012.
- ERTÜRK, Ö.; YAVUZ, C.; SIRALI, R.. The antimicrobial activity of propolis from ordu province of Turkey. *Mellifera*, 14. 2014.
- EREMIA, N.; DABIJA, T. The content of micro and macroelements in propolis. *Bulletin USAMV-CN*, v. 63, n. 4, p. 176-178, 2007.
- FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P.. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 1, 2006.
- GARZA-GONZALEZ, E.; MORFIN-OTERO, R.; LLACADIAZ, J. M.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec)* in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. *Epidemiology and infection*, 138(05), 645-654. 2010.
- GOMES, M. F., ÍTAVO, C. C., LEAL, C. R., ÍTAVO, L. C., & LUNAS, R. C. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. *Pesq. Vet. Bras*, 36(4), 279-282. 2016.
- GROOVE D.C.; RANDALL W.A. Assay methods of antibiotic: a laboratory manual (Antibiotics monographs 02). New York: Medical Encyclopedia Inc., 238p. 1955.
- HENDI, N. K. K.; NAHER, H. S.; AL-CHARRAKH, A. H.. In vitro antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis. *Journal of medicinal plants research*, v. 5, n. 20, p. 5058-5066, 2011.
- HEIMBACH, N. D. S.; ÍTAVO, C. C. B. F.; LEAL, C. R. B.; ÍTAVO, L. C. V.; DA SILVA, J. A.; SILVA, P. C. G.; GOMES, M. D. F. F.. Resíduo da extração de própolis como inibidor bacteriano in vitro. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 17(1). 2016.
- HOGUE, A.T., EBEL, E.D., THOMAS, L.A., SCHLOSSER, W., BUFANO, N. AND FERRIS, K.. Surveys of *Salmonella enteritidis* in unpasteurized liquid egg and spent hens at slaughter. *J. Food Protect.*, 60: 1194-200. 1997.
- JORGE, R.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; GREGÓRIO JUNIOR, L. E.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, M. L. A. Brazilian Propolis: Seasonal Variation of the Prenylated *p*-Coumaric Acids and Antimicrobial Activity. *Pharmaceutical Biology*, v.46, p.889-93, 2008.
- KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T.. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116(2), 452-461. 2009.
- MARCUCCI, M. C., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., BANKOVA, V. S., DE CASTRO, S. L., DANTAS, A. P.,

- PAULINO, N.. Phenolic Compounds from Brazilian Propolis with Pharmacological Activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.105-12, 2001.
- MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J.; CHMURZYNSKI, P. Treatment of mastitis in cows using an extract of propolis. *Medycyna Weterinaryjna*, 45: 392-395. 1989.
- NICULAE, M.; LAURA, S. T. A. N.; EMŐKE, P. A. L. L.; PAȘTIU, A. I.; BALACI, I. M.; MUSTE, S.; SPÎNU, M.. In vitro Synergistic Antimicrobial Activity of Romanian Propolis and Antibiotics against *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2), 327-334. 2015.
- NOORI, A. L.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K.. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *International journal of medical sciences*, 9(9), 793-800. 2012.
- ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FUNARI, S.R.C.; BARBOSA, L. E.; FERNANDES JR, A.. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 11: 109-116. 2005.
- PARK, Y. P.; MASA HARU, I.; SILVA, J. A. A.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 18, p. 313-318, 1998.
- PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev. bras. Farmacognosia*, Curitiba, vol. 17, n. 1, p. 102 - 107, 2007.
- PEREIRA, D.S.; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B.; ALVES DA SILVA, J. B.; AGRA DA SILVA, R.; SILVEIRA, D. C.. Histórico e principais usos da própolis apícola. *Agropecuária Científica no Semiárido*. V. 11, n. 2, p. 01-21, abr-jun, 2015.
- PORTILHO, D. R.; MELO, I. A.; GUERRA, R. C.; BATISTA, H. L.; FERNANDES, C. H. C.. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. *Rev Cient do ITPAC [Internet]*. 2013.
- RIBEIRO, A. S. C.; PINTO, A. T. M., DE JESUS SILVA, D., & PEIXOTO, T. A. (2015). Atividade Antimicrobiana de Diferentes Colutórios Fitoterápicos. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 19(4). 2015.
- SAEKI, E. K.; DE MELLO PEIXOTO, E. C. T.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSO, P. F.; MONTEIRO, R. M.. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. *Acta Veterinaria Brasilica*, 5(3), 284-290. 2012.
- SFORCIN, J. M. Seasonal Effect on Brazilian Propolis Antibacterial Activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, p.243-9, 2000.
- SOUZA, E. A. D.; INOUE, H. T.; FERNANDES JÚNIOR, A.; VEIGA, N.; ORSI, R. D. O.. Influence of seasonality and production method on the antibacterial activity of propolis. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 36(1), 49-53. 2014.
- STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M.. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, 158(4), 353-357. 2003.
- SINHORINI, W. A.; BORDIN, J. T.; VIGNOTO, V. K. C.; CARDOZO, R. M.; MARTINS, R. R.; WOSIACKI, S. R.. Atividade antibacteriana in vitro da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 1(2), 107-111. 2015.
- TABARELLI, Marcelo; MELO, M. D. V. C.; LIRA, O. C. A Mata Atlântica do nordeste. *Mata Atlântica: uma rede pela floresta*. São Paulo, Atthalaia Gráfica e Editora Ltda, p. 149-164, 2006.
- VALDES, G.; RUIZ, M.; MARTIN, M.. Antibacterial characterization of propolis from Madruga and Mariel municipalities in the Province of Havana. *Ciencia y Tecnica en la Agricultura*. Apicultura, 5: 25-37. 1989.