



### Atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis sobre bactérias ruminais<sup>1</sup>

Sílvia Cristina de Aguiar<sup>2</sup>, Lúcia Maria Zeoula<sup>3</sup>, Evelyne Forano<sup>4</sup>, Pedro Braga Arcuri<sup>5</sup>, Selma Lucy Franco<sup>6</sup>,  
Odimári Pricila Pires do Prado<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado da primeira autora, financiada pelo CNPq.

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEM. e-mail: silariana@hotmail.com

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia – UEM. Bolsista do CNPq. e-mail: lmzeoula@uem.br

<sup>4</sup>Institute National de la Recherche Agronomique (INRA), UR454 Microbiologie, Saint-Genès-Champagnelle, França.

<sup>5</sup>Embrapa Labex Europe - Agropolis International, Montpellier, França.

<sup>6</sup>Departamento de Farmácia e Farmacologia – UEM. <sup>7</sup>Departamento de Zootecnia – UEL.

**Resumo<sup>a</sup>:** Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de três diferentes extratos de própolis (LLOS) sobre sete cepas bacterianas ruminais (*Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus* 7, *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071, *Prevotella albensis* DSMZ 11370, *Peptostreptococcus* sp. D1, *Clostridium bifermentans* C1.16 e *Streptococcus equinus* C3.1). Foram testados os LLOS B1, C1 e C3 contendo, respectivamente, 148,13; 121,13 e 70,27 mg de compostos fenólicos/g. O ensaio foi conduzido em tubos Hungate (4 mL do meio de cultura) com diferentes concentrações de própolis (250, 500 e 1000 µg/mL) e os tubos controle (CON) continham o meio de cultura e etanol a 80%. Após o período de incubação (15 h), o crescimento foi monitorado a partir do aumento na densidade óptica. Os LLOS inibiram o crescimento de seis cepas, com maior inibição a 1000 µg de propolis. As cepas de *F. succinogenes*, *C. bifermentans* e *Peptostreptococcus* sp. foram as mais sensíveis aos LLOS e *S. equinus* C3.1 foi resistente a todos os extratos. O estudo das propriedades biológicas da própolis deve ser ligado a uma investigação detalhada da sua composição química, para melhor compreender os seus efeitos.

**Palavras-chave:** aditivo, atividade antibacteriana, bactérias ruminais, flavonoides, inibição

### Antimicrobial activity of different propolis extracts against ruminal bacteria

**Abstract:** The objective was to evaluate the antimicrobial activity of three different propolis extracts (LLOS) against seven strains of ruminal bacteria (*Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus* 7, *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071, *Prevotella albensis* DSMZ 11370, *Peptostreptococcus* sp. D1, *Clostridium bifermentans* C1.16 and *Streptococcus equinus* C3.1). Were tested LLOS B1, C1, C3 containing, respectively, 148.13, 121.13 and 70.27 mg of phenolic compounds/g. The assay was conducted in Hungate tubes (4 mL of the growth medium) with different concentrations of propolis (250, 500 and 1000 µg/mL) and the control tubes (CON) contained the growth medium and ethanol at 80%. After the incubation period (15 h), bacterial growth was monitored from the increase in optical density. The LLOS inhibited the growth of six strains, with greater inhibition at 1000 µg/mL. The strains of *F. succinogenes*, *C. bifermentans* and *Peptostreptococcus* sp. were the most sensitive to LLOS and *S. equinus* C3.1 was resistant to all propolis extracts. The study of the biological properties of propolis should be linked to a detailed investigation of its chemical composition, to better understand its effects.

**Keywords:** additive, antibacterial activity, flavonoids, inhibition, ruminal bacteria

### Introdução

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas a partir de exudatos e brotos de plantas e misturado com ceras e enzimas. Nas últimas décadas, muitos trabalhos envolvendo sua composição e propriedades biológicas têm sido publicados, revelando o interesse dos pesquisadores neste produto apícola e em seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (Sforcin & Bankova, 2011). Devido à sua atividade antimicrobiana, a própolis também tem sido estudada na nutrição de ruminantes, como possível alternativa aos antibióticos e aditivos químicos utilizados na produção destes animais. Muitos destes estudos mostraram que a própolis foi eficiente em aumentar a digestibilidade da matéria seca e nutrientes em bubalinos e o fluxo de proteína bruta para os intestinos em bovinos, além de inibir a produção de amônia *in vitro* (Prado et al., 2010a; Prado et al., 2010b; Ozturk et al., 2010). Entretanto, pouco se sabe da atividade antimicrobiana da própolis sobre a microbiota ruminal.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de três diferentes extratos de própolis (LLOS) sobre sete cepas bacterianas encontradas no rúmen.

### Material e Métodos

Sete bactérias ruminais foram testadas para a atividade antimicrobiana da própolis, incluindo três cepas fibrolíticas (*Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus* 7 e *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071), duas cepas proteolíticas (*Prevotella albensis* DSMZ 11370 e *Peptostreptococcus* sp. D1) e duas cepas (*Clostridium*



*bifermentans* C1.16 e *Streptococcus equinus* C3.1) anteriormente isoladas do rúmen de vacas leiteiras que receberam própolis na dieta e consideradas como “tolerantes à própolis” (Prado et al, 2010c). A própolis utilizada foi coletada no apiário localizado na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM). O apiário localiza-se no interior de uma reserva de eucaliptos (*Eucalyptus* sp.) rodeada de mata nativa, onde também encontra-se o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Para este estudo, foram selecionados três extratos de própolis (LLOS), os quais diferiram na concentração de própolis (5 a 30% p/v), representada por letras (B e C) e na diluição alcoólica (60 a 96% v/v) utilizada na extração dos compostos ativos, representada por números (1 e 3) constituindo-se, portanto, dos seguintes extratos: LLOS B1, LLOS C1 e LLOS C3. As informações referentes às concentrações de própolis e diluições alcoólicas estão protegidas pelo pedido de patrimônio intelectual sob o nº 0605768-3. A quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos foi quantificada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); onde 148,13; 121,13 e 70,27 mg de compostos fenólicos/g foram quantificados para os LLOS B1, C1 e C3, respectivamente. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos secos de própolis foram diluídos em 80% de etanol a fim de obter 100 µg de própolis/mL de solução, a qual foi filtrada e estocada ao abrigo da luz. O ensaio da atividade antimicrobiana foi conduzido em tubos Hungate contendo 4 mL do meio de cultura (Leedle & Hespell, 1980) com três diferentes concentrações de própolis (250, 500 e 1000 µg/mL do meio de cultura). Os tubos controle (CON) contêm o meio de cultura e o etanol a 80%. Os tubos foram então inoculados pelas cepas e incubados a 39°C por 15 horas. Todo o procedimento foi realizado em condições anaeróbias. Após o período de incubação, o crescimento foi monitorado a partir do aumento na densidade óptica (1 cm de cubeta, 600 nm). O ensaio foi conduzido em triplicata e os valores médios são reportados. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey, considerando 1% o grau de significância.

### Resultados e Discussão

Os extratos LLOS inibiram o crescimento de seis cepas ( $P < 0,01$ ), com elevado efeito inibitório para a maior concentração (1000 µg de propolis/mL do meio de cultura) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Atividade antimicrobiana de extratos secos de própolis (LLOS) sobre cepas ruminais

LLOS <sup>1</sup>	Crescimento nas diferentes concentrações <sup>2</sup>				CV,%	P
	CON	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL		
<i>Prevotella albensis</i> DSMZ 11370						
B1	1,921a	1,680ab	1,523ab	1,351b	6,18	0,002
C1	1,921a	1,689ab	1,737a	1,468b	3,49	<0,001
C3	1,921a	1,631ab	1,674a	1,322b	5,25	<0,001
<i>Ruminococcus albus</i> 7						
B1	1,329a	1,157b	1,073b	0,773c	3,30	<0,001
C1	1,329a	1,135ab	0,842b	0,159c	8,73	<0,001
C3	1,329a	1,142b	1,146b	0,246c	2,19	<0,001
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> DSMZ 3071						
B1	1,492a	1,416a	1,493a	0,056b	2,75	<0,001
C1	1,492a	1,443a	1,487a	0,109b	5,40	0,000
C3	1,492	1,428	1,481	1,405	3,46	0,206
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85						
B1	1,093a	1,021a	0,037b	0,003b	5,08	<0,001
C1	1,093a	1,072a	0,037b	0,088b	9,04	<0,001
C3	1,093a	1,071a	0,294b	0,000c	7,17	<0,001
<i>Clostridium bifermentans</i> C1.16						
B1	1,041a	1,005a	0,413b	0,010c	14,94	<0,001
C1	1,041a	0,945a	0,460b	0,009c	10,21	<0,001
C3	1,041a	0,830a	0,800a	0,097b	10,03	<0,001
<i>Peptostreptococcus</i> sp. D1						
B1	0,671a	0,430a	0,043b	0,000b	28,66	<0,001
C1	0,671a	0,423b	0,030c	0,000c	13,48	<0,001
C3	0,671a	0,585a	0,057b	0,000b	19,88	<0,001
<i>Streptococcus equinus</i> C3.1						
B1	1,795	---	---	1,708	2,58	0,144
C1	1,795	---	---	1,727	3,81	0,341
C3	1,795	---	---	1,767	1,62	0,365

<sup>1</sup>B1 = 148,13 mg de compostos fenólicos/g de extrato seco de própolis; C1 = 121,13 mg de compostos fenólicos/g de extrato seco de própolis; C3 = 70,27 mg compostos fenólicos/g de extrato seco de própolis. <sup>2</sup>Valores expressos em densidade óptica a 600 nm. Médias seguidas por diferentes letras na mesma linha são estatisticamente diferentes segundo o teste de Tukey ( $P < 0,01$ ),  $n = 3$ .



A cepa de *S. equinus* mostrou ser resistente a todos os extratos em todas as concentrações testadas, confirmando sua tolerância à própolis (Prado et al. 2010c); porém, *C. bifermentans*, também supostamente isolada como “tolerante à própolis”, apresentou elevada sensibilidade à todos os extratos. As cepas de *R. albus* 7 e *Peptostreptococcus* sp. foram inibidas pela menor concentração testada (250 µg/mL) dos extratos LLOS B1 e C3 (para *R. albus*) e C1 (para *Peptostreptococcus* sp.). *F. succinogenes* S85 apresentou sensibilidade aos LLOS somente para as duas maiores concentrações de própolis (500 e 1000 µg/mL), enquanto *P. albensis* foi sensível apenas a 1000 µg/mL. A atividade antimicrobiana contra *B. fibrisolvens* só foi observada na maior concentração de própolis (1000 µg/mL) para os LLOS B1 e C1, sendo resistente ao LLOS C3. A cepa *Peptostreptococcus* sp. D1, uma bactéria hiper-produtora de amônia, apresentou elevada sensibilidade aos LLOS em todas as concentrações testadas, exceto para a menor concentração de B1 e C3 (250 µg/mL). De acordo com Sforcin & Bankova (2011), a variação na composição química da própolis dificulta a sua padronização, e os diferentes solventes aplicados à sua extração (etanol, metanol e água) podem extrair diferentes compostos influenciando, desta forma, sua atividade biológica. A quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos confirma esta afirmação, uma vez que o LLOS C3 (maior concentração de própolis e maior teor alcoólico) foi o extrato com menor quantidade de compostos fenólicos e, conseqüentemente, menor atividade antimicrobiana contra *C. bifermentans* (em relação aos demais extratos) e nenhuma atividade contra *B. fibrisolvens*.

Em paralelo, a atividade antimicrobiana de alguns ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e Artepillin C) e flavonoides (crisina e naringenina), os quais são encontrados na própolis brasileira, foi avaliada sobre as cepas bacterianas inibidas pelos extratos de própolis. O ácido cafeico apresentou atividade antimicrobiana contra *R. albus* 7 e *C. bifermentans* (a 1,5 mg/mL), enquanto o ácido *p*-cumárico e Artepillin C apresentaram atividade contra *C. bifermentans* (a 1,0 mg/mL e 80 µg/mL para o ácido *p*-cumárico e Artepillin C, respectivamente). Para os flavonoides, a naringenina teve efeito inibitório contra todas as cepas (a 33,3 µg/mL para *B. fibrisolvens*, *F. succinogenes* e *C. bifermentans*, e a 53,3 µg/mL para *R. albus* 7 e *P. albensis*), enquanto nenhuma cepa foi sensível à crisina (a 1,0 mg/mL). De maneira conjunta, estes resultados sugerem que a atividade antimicrobiana da própolis não é devido a um único componente, mas, preferencialmente, devido ao sinergismo que ocorre entre seus compostos ativos, os quais são diretamente influenciados pelo método de extração e solventes utilizados (Sforcin & Bankova, 2011).

### Conclusões

Os extratos de própolis inibiram o crescimento de seis cepas, com maior inibição para a concentração contendo 1000 µg de propolis. As cepas de *F. succinogenes*, *C. bifermentans* e *Peptostreptococcus* sp. foram as mais sensíveis aos LLOS e *S. equinus* C3.1 foi resistente a todos os extratos de própolis. A própolis possui, portanto, ação antimicrobiana tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, assim como contra várias espécies. A condição de extração influenciou a atividade antimicrobiana, uma vez que os LLOS B1 e C1 apresentaram maior poder inibitório do que o C3, o qual contém menor quantidade de compostos fenólicos. O estudo das propriedades biológicas da própolis deve ser ligado a uma investigação detalhada da sua composição química, para melhor compreender os seus efeitos. O mecanismo de ação da própolis contra bactérias ruminais individuais, bem como seu efeito sobre o equilíbrio das comunidades microbianas do rúmen, permanece a ser elucidado.

### Literatura citada

- LEEDLE, J.A.; HESPELL, R.B. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate utilizing subgroups in rumen bacterial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, n.4, p.709-719, 1980.
- OZTURK, H.; PEKCAN, M.; SIRELI, M. et al. Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v.57, p.217-221, 2010.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2055-2065, 2010a.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.1336-1345, 2010b.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA L.P.P. et al. Isolation and expeditious morphological, biochemical and kinetic characterization of propolis-tolerant ruminal bacteria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n.9, p.2048-2054, 2010c.
- SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.253-260, 2011.

\*Como citar este trabalho: AGUIAR, S.C.; ZEOULA, L.M., FORANO, E. Atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis sobre bactérias ruminais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012. (CD-ROM).