

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**ANA CAROLINA FALCADE
IAGO DE MATOS PINTERICH
YURI BRAMBILLA PINTERICH**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
PRÓPOLIS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO
E MACRODILUIÇÃO**

Bauru

2010

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ANA CAROLINA FALCADE

IAGO DE MATOS PINTERICH

YURI BRAMBILLA PINTERICH

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
PRÓPOLIS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO E
MACRODILUIÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de Farmacêutico,
sob orientação da Profa. Dra. Silvana
Torossian Coradi.

Bauru

2010

**ANA CAROLINA FALCADE
IAGO DE MATOS PINTERCH
YURI BRAMBILLA PINTERICH**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PRÓPOLIS
PELOS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E MACRODILUIÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico, sob orientação da Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Esp. Fernando Tosse Alves Neves
Universidade do Sagrado Coração

Prof Dr. Paulo Henrique Weckwert
Universidade do Sagrado Coração

Data: 14 de dezembro de 2010.

Bauru, 2010

DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho aos nossos pais, que possibilitaram a nossa graduação no curso superior de Farmácia,

Aos amigos que estiveram ao nosso lado ao longo desses anos,

Aos professores em geral que contribuíram para edificar muitos dos nossos conhecimentos e nos passaram suas experiências.

E a todas as pessoas que indiretamente nos deram apoio para que pudéssemos seguir em frente.

E a Deus que permitiu que estivéssemos aqui.

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Sagrado Coração, que possibilitou a realização deste trabalho; aos funcionários do Laboratório de Biologia e Laboratório de Análises Clínicas pela colaboração;

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwert, por sua ajuda e conselhos;

Ao Prof. Esp. Fernando Tozze Alves Neves por sua dedicação, paciência e colaboração;

À Prof. Especialista Cláudia Sibely Salomão Carlomagno de Paula pelo seu apoio e boa vontade sempre;

E a todos que estiveram envolvidos de maneira direta e indireta a este trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À nossa orientadora, Profa Dra Silvana Torossian Coradi, que nos concedeu grande parte dos seus dias empenhando-se para o desenvolvimento de um trabalho de qualidade. Seu apoio permitiu a realização deste e norteou-nos para o caminho do conhecimento, sempre nos corrigindo ao longo do desenvolvimento e mostrando novas possibilidades. Não permitindo que desanimássemos no decorrer dos testes. Estando sempre ao nosso lado e mostrando como ser uma profissional respeitada e admirável que é.

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente.
Excelência, então, não é um modo de agir, mas
um hábito”.

Aristóteles

RESUMO

Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos e drogas imunossupressoras, doenças causadas por patógenos oportunistas têm ganho cada vez mais destaque, principalmente agentes como *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são microorganismos que apresentam grande resistência a antimicrobianos. Contudo tem se avaliado diversas substâncias, como extratos vegetais, venenos e toxinas na tentativa de se obter drogas alternativas, entre eles o própolis, que contém substâncias como os flavonóides, os ácidos fenólicos e cetonas responsáveis pela atividade antimicrobiana. A proporção destas substâncias antimicrobianas é variável, pois o própolis apresenta variabilidade em sua composição química em função de sua origem geográfica, o que se torna importante para o controle de qualidade e efetividade no uso terapêutico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do própolis sob os microorganismos, pelos métodos da difusão em disco e da macrodiluição sobre *C. albicans* em caldo de cultura. Observou-se discreta inibição do crescimento das cepas testadas, em especial as leveduras da espécie *Candida albicans* no método da macrodiluição, além da inibição de formação de pseudohifas. Contudo estudos para uma melhor caracterização dos componentes do própolis, dosagens, padronizações devem ser realizados, para que se possa determinar seu potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: sensibilidade, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, própolis

ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics and immunosuppressive drugs, diseases caused by opportunistic pathogens have gained increasing prominence mainly agents such as *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* which are microorganisms that can have great antimicrobial resistance. However it has been evaluating various substances as plant extracts poisons and toxins in an attempt to obtain drugs alternatives including propolis which contains substances such as flavonoids, phenolic, acids and ketones responsible for the activity antimicrobial. The proportion of these antimicrobial substances is variable because propolis presents variability in chemical composition as a function of geographical origin which is important for quality control and effectives in therapeutic use. The aim of this study was to evaluate the action of propolis in the microorganisms by disk diffusion methods and macrodilution on *C.albicans* in culture. We observed discrete inhibition of growth of the strains in particular the yeastes *Candida* Species *albicans* in the macrodilution method besides the inhibition of however pseudohyphae studies to better characterize the components of propolis dosages standards should be made so that we can determine its antimicrobial activity.

Keywords: sensitivity, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, propolis

Lista de Ilustrações

Figura 1- Discreto halo de inibição para <i>S. aureus</i>	24
Figura 2- Halo de inibição de 18 mm para <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 3- Discreto halo de inibição para <i>C. albicans</i>	25

Lista de tabelas

Tabela 1- Relação de números de leveduras e formação de pseudohifas 24 nos tubos contendo leveduras *C. albicans*, nos tubos tratados com própolis, fluconazol e álcool.

Sumário

1.0 Introdução	13
2.0 Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3.0 Material e método	20
3.1 Microorganismos utilizados	20
3.2 Obtenção e preparo do própolis	20
3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana	21
3.3.1 Métodos de inibição em disco (Método <i>Kirby Bauer</i>)	21
3.3.2 Método da macrodiluição em tubos	21
3.4 Determinação da concentração de quercetina no própolis	22
4.0 Resultados	23
5.0 Discussão	26
6.0 Considerações Finais	30
7.0 Referências	31

1.0 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas sempre foram as principais causas de morbidade e mortalidade para seres humanos, de diferentes idades, e podem ser provocadas pelos mais diferentes agentes infecciosos, em especial as bactérias. Essa gravidade ocorre devido à velocidade de evolução do quadro clínico, e podem ser adquirida por via respiratória, digestiva, sexual entre outras.

O desenvolvimento da quimioterapia antimicrobiana teve início na década de 30 com a descoberta das sulfonamidas e as penicilinas. Posteriormente, nas décadas de 50 e 70, começaram a surgir epidemias causadas por *Staphylococcus aureus* multiresistentes e linhagens resistentes à penicilina, dando início ao problema da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos (AMOROSO,2002; JAWETZ et al., 1998). Entre os muitos agentes infecciosos que apresentam resistência aos antimicrobianos normalmente utilizados, podemos destacar as infecções causadas pelas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas* e pela levedura *Candida albicans*, causadores de doenças graves, exigindo diagnóstico e tratamento precoce e adequado.

S. aureus, bactéria que faz parte da biota natural do homem, é comumente encontrada na pele e mucosas, se apresentam morfológicamente como cocos Gram positivos, agrupados em cachos, apresentam metabolismo aeróbio facultativo e prova da catalase positiva (MURRAY et al., 2006 ; PELCZAR et al., 1996). Apresentam diversos fatores de virulência, muita resistência às defesas imunológicas do indivíduo e importante resistência a

terapêutica aplicada. Esta bactéria habita com freqüência a nasofaringe, a partir do qual pode facilmente contaminar as mãos e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica (MURRAY et al., 2006; PELCZAR et al., 1996).

Em geral, bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência aos fármacos utilizados como agentes terapêuticos. Segundo Tavares (2000), estafilococos vêm mostrando crescente resistência também aos beta-lactâmicos penicilinase-resistentes, registrando-se índices de resistência de 30% a 66%, notavelmente em hospitais de grande porte, com serviços de emergência aberto ao público e centros de referência para pacientes infectados. Cepas de *S. aureus* multiresistentes se constituem em um grande problema de saúde pública por estarem associadas a muitos casos de infecções graves, como em pacientes imunodeprimidos e nas infecções hospitalares (WILLIAMS et al., 2004).

P. aeruginosa está amplamente distribuída no ambiente e é capaz de resistir por longos períodos em ambientes adversos. Apresentam-se morfológicamente como bacilos Gram negativos, não fermentadoras e oxidase positiva (MURRAY et al., 2006). Além da característica intrínseca de apresentar baixo nível de sensibilidade aos antimicrobianos, diversos mecanismos de resistência têm sido identificados como hiper-expressão de bombas de efluxo, produção de β -lactamases, perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa (LI et al., 2000; LIVERMORE., 2002; MASUDA, 1992; GALES et al., 2001).

Freqüentemente, isolados de *P. aeruginosa*, apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive as cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos, como imipenem e meropenem. Por estas razões, as infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes estabelecem um substancial desafio para a terapia antimicrobiana, trazendo ao cenário atual a inevitável necessidade de identificar essas bactérias multirresistentes e a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados na terapêutica (DAVIS,1979).

Além dessas bactérias, leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por infecções recorrentes, algumas muito graves. As leveduras desse gênero incluem 81 espécies, sendo *C.albicans*, *C. glabrata*, *C.krusei*, *C.guilhiermondii*, *C.tropicalis* as mais freqüentes. As colônias se apresentam com aspecto cremoso, de cor branco-amarelado e microscopicamente como células globosas e arredondadas, crescimento a partir da formação de blastoconídeos e pseudohifas abundantes.(LACAZ,1986; MURRAY, 2006). A ruptura do equilíbrio entre as leveduras do gênero *Candida* e a microbiota da qual faz parte propicia o estabelecimento da candidíase. Este fungo leveduriforme apresenta como principais fatores de virulência a aderência, dimorfismo (formação de micélio), variabilidade fenotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares (GHANNOUM et al.,1996 ; KLOTZ et al.,1991).

Os principais grupos de antifúngicos em uso na terapêutica, com atividade sobre as leveduras desse gênero, compreende os antibióticos poliênicos como a anfotericina B e nistatina, e os derivados azólicos (imidazólicos ou triazólicos). Dentre todos os antifúngicos, a anfotericina B é

considerado o mais efetivo, no tratamento de infecções pelas leveduras desse gênero, com atividade antifúngica *in vivo* e *in vitro* (MIMS, 2005).

Diante de microrganismos importantes e cada vez mais multiresistentes, surge a necessidade de novos fármacos e alternativas de tratamento, e o própolis pode ser uma boa opção natural e eficaz.

Própolis é uma denominação genérica que descreve uma mistura de substâncias, colhidas por abelhas melíferas de vegetais, acrescida de secreções salivares, cera e pólen (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2001). Utilizada desde os tempos dos Faraós, suas propriedades curativas foram sistematicamente relatadas ao longo dos tempos (MATSUNO,1997). Apresentam-se como um material resinoso, geralmente de cor marrom-amarelado, se caracteriza por um gosto e odor espinhoso e frequentemente desagradável. Diferentes estudos têm identificados mais de 200 substâncias na sua composição, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres diterpenos e sesquiterpenos, lignanas aldeídos aromáticos, alcoóis, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (BANKOVA et al., 1999; MARKHAN et al., 1996; PARK et al.,2002). Essa complexidade de constituintes e características dificulta sua descrição, análise e utilização em escala industrial. (GHISALBERTI,1978 ; BURDOCK,1998).

BRAGA et al. (2002), relataram suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatória, imunomoduladora, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, antitumoral, anti-HIV e anticarcinogênica. A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua função sobre *S. aureus* (FERNANDES JUNIOR et al.,1995; FERNANDES

JUNIOR et al., 2003; PINTO et al., 2001); *S. pyogenes* (BOSIO et al., 2000); *Candida* sp (SFORCIN et al., 2000; STEPANOVIC et al., 2003) e sobre inúmeros outros microrganismos (BANSKOTA, 2001). Foi verificado também que bactérias Gram positivas se mostram mais sensíveis que as Gram negativas aos extratos de própolis (PINTO et al., 2001).

Flavonóides presentes, juntamente com ácidos fenólicos e cetonas, são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos do própolis. Outros compostos são óleos voláteis e ácidos aromáticos (5 a 10%), ceras (30 a 40%), resinas, bálsamo e pólen que é uma rica fonte de elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco (CASTALDO & CAPASSO, 2002, PIETTA et al., 2002). O mecanismo de atividade antibacteriana é considerado complexo e pode ser atribuído ao sinergismo entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos. O sinergismo entre eles é importante para que haja atuação na inibição da divisão celular; desestruturação da membrana citoplasmática e da parede celular; inibição da síntese de proteína e o RNA polimerase; inibição enzimática (KROL et al., 1993).

A proporção destas substâncias é variável em função do local e da época de coleta (STEPANOVIC et al., 2003). Portanto, a origem geográfica do própolis é importante no controle de qualidade e para sua efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002).

Este estudo se traduz como mais uma ferramenta que pode contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas no controle microbiano. Diversos estudos foram realizados com a finalidade de se avaliar atividade

antimicrobiana do própolis, mas ainda não há padronização de como utilizar o produto, dose, apenas poucas normativas apresentadas pelo Ministério da Agricultura (2001). A quercetina é um dos produtos com atividade farmacológica do própolis, com estudos que identificam sua atividade como antioxidante, antiinflamatório, antiviral, entre outras (OLIVEIRA & BERRETTA, 2007).

É necessário determinar qual a dose de quercetina que apresenta efeito inibitório de crescimento, com atividade bacteriostática ou bactericida, fungistática ou fungicida, e para isso ainda são necessários muitos estudos. Assim, medidas devem ser adotadas para solucionar as falhas com a antibióticoterapia, como por exemplo, controlar a venda e uso de antibióticos, ampliar pesquisas para melhor compreender o mecanismo genético de resistência de bactérias e fungos aos medicamentos e continuar as pesquisas de novas moléculas com atividade sobre o crescimento de microrganismos, sejam de origem sintética ou natural.

2.0 OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar atividade inibitória do própolis frente à cultura de bactérias e fungos.

2.2-Objetivos Específicos

- Avaliar atividade inibitória do própolis frente às bactérias *S. aureus*, *P.aeruginosa* e a levedura *C. albicans* pelos métodos de difusão em disco (*Kirby-bauer*) e da macrodiluição, em tempos de 24 e 48 horas.
- Comparar o efeito inibitório do crescimento da *C.albicans* sob efeito de diferentes concentrações do própolis pelo método de difusão em disco e macrodiluição, nos tempos de 24 e 48 horas.
- Determinar a concentração de quercetina no própolis utilizado nesse experimento.

3.0 MATERIAL E MÉTODO

3.1- Microrganismos Utilizados

Foram utilizados neste experimento cepas de *C. albicans* (ATCC 10231), pertencentes à micoteca do Laboratório de Biologia da Universidade do Sagrado Coração (USC) e cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932) identificada pelo crescimento em ágar cetremide (KONEMAN et al., 1997).

3.2 Obtenção e Preparo do Própolis

Foi utilizado própolis em forma bruta, obtido de *Apis mellifera*, de apiário comercial.

As diluições foram realizadas na hora do uso de cada experimento. Para a técnica de difusão em disco, o própolis puro foi diluído em álcool 70% na concentração de 20%, e posteriormente re-diluído a 10; 5; 2,5; 1,25; 0,6 e 0,3%, em álcool a 35%.

Para a técnica de macrodiluição foi utilizada própolis pura, diluída em álcool 50% e re-diluído em álcool a 10%.

3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

3.3.1 Método de Inibição em Disco (Método de Kirby-Bauer)

Para determinação da atividade antibacteriana e antifúngica foi utilizado o método de Kirby-Bauer ou difusão em disco (CLSI, 2006). As cepas selecionadas foram mantidas em ágar BHI (*Brain and Hart Infusion*), e diluídas segundo a escala 0,5 de Mc Farland (1,8.10⁸ unidades formadoras de colônia/ml). Foram inoculadas em placas de ágar BHI com um swab de algodão estéril. Os discos de papéis estéreis, de cinco milímetros, colocados sobre o ágar e embebidos com 5 µl das diferentes concentrações do própolis. Discos de antibióticos foram utilizados como inibidores de crescimento nas placas inoculadas com bactérias, e de fluconazol para *C. albicans*. Como controle negativo utilizou-se discos de papel embebidos em álcool a 35%.

Todas as culturas foram incubadas em estufa a 37° C e as leituras efetuadas após 24 e 48 horas de incubação. A leitura foi realizada medindo-se, em milímetros, o halo de inibição formado.

3.3.2 Método da Macrodiluição em Tubo

Para a avaliação antifúngica do própolis sobre *C. albicans*, também foi realizado o método da macrodiluição em caldo. Foram preparados 12 tubos de ensaio (7x1), sendo que em cada um foi adicionando 2,0 mL do meio de cultura RPMI e 100 µL da cepa de *C. albicans* previamente ajustada na escala 0,5 de McFarland. Esses tubos foram então divididos em quatro grupos assim constituídos:

Grupo I – Considerado grupo controle (meio RPMI e suspensão de levedura).

Grupo II – adicionado 100 µl de Fluconazol a 100 mg/ml (controle de crescimento negativo)

Grupo III –adicionado 100 µl de própolis

Grupo IV- adicionados 100 µl de álcool a 10° GL (controle do álcool utilizado na preparação e diluição do própolis).

Os tubos preparados foram incubados a 30 °C e submetidos a contagem em câmara de *Neubauer*, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas da incubação.

Todo o experimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 Determinação da concentração de quercetina no própolis

A determinação de quercetina no própolis foi realizada utilizando a metodologia proposta pela Farmacopéia Alemã (1978). Foi feita a extração de flavonóides totais através do Método de *Folin Ciocalteu*, com pequenas modificações. Inicialmente foi feita a preparação do extrato, a partir de 2,5 gramas do própolis bruto, tratado com metanol em extrator *Soxhlet* por aproximadamente seis horas, até reação negativa com cloreto férrico III 5%. Após resfriamento, os extratos foram filtrados, em papel de filtro, e então diluídos em balão volumétrico de 250 mL a temperatura ambiente. Em seguida feito o doseamento do flavonóide, transferindo-se 4 ml do extrato inicial obtido do balão de 250mL para um balão volumétrico de 50 ml e o volume completado com água destilada. Alíquotas de 2ml foram colocadas em 3 tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 6 ml de metanol e 2ml de cloreto de alumínio. Após 10 min, foram feitas as leituras em espectrofotômetro, em 420 nm de comprimento de onda, zerando com solução de metanol (6ml) e cloreto de alumínio (2ml). Como referência, foi construída uma curva padrão preparada com solução de quercetina.

Para a curva padrão foram pesadas exatamente 10 mg de quercetina e dissolvidos em 100 ml de metanol. Foram transferidos 10ml a um balão volumétrico e o volume ajustado em 50 ml finais com metanol. Da solução final de quercetina foram retiradas amostras de 1, 2, 3, 5 e 8 ml e transferidas para tubos de ensaio. A cada tubo de ensaio foi adicionado 2 ml de solução aquosa de $AlCl_3$ 10%. Posteriormente adicionou-se aos tubos, volumes de metanol para obter o volume final de 10 ml. Após 10 minutos, foram feitas leituras em espectrofotômetro, em 420 nm.

4.0 Resultados

Este estudo avaliou o efeito inibitório de crescimento do própolis sobre o crescimento de bactérias e levedura pelas técnicas de difusão em disco e para levedura também pela técnica da macrodiluição em tubo.

Pela técnica de diluição em disco foi possível observar efeito inibitório sobre cepa de *S. aureus*, nas concentrações de própolis diluído a 5 e 2,5% , após 24 horas de incubação (Figura 1). Esse efeito se manteve nas 48 horas de incubação. Para cepas de *P. aeruginosa*, foi possível observar halo de inibição de 18 mm, para todas as concentrações avaliadas, mas somente após 48 horas de incubação (Figura 2). Mas ao se comparar esse efeito inibitório ao redor de cada disco, tem-se a impressão de que é o álcool quem está agindo. Para *C. albicans*, se verificou halo de inibição discreto nas concentrações de 5 e 2,5 %, após 48 horas de incubação (Figura 3).

Pela técnica de macrodiluição em tubo, observou-se crescimento da levedura nos tubos tratados com própolis, mas inibição na formação de pseudohifas quando comparado ao tubo controle, como está demonstrado na tabela 1.

Tabela 1- Relação de números de leveduras e formação de pseudohifas nos tubos contendo leveduras *C. albicans*, nos tubos tratados com própolis, fluconazol e álcool.

Tempo de incubação (hora)	Número de leveduras / pseudohifas / ml meio			
	Grupo I (Grupo controle)	Grupo II (Grupo com adição de fluconazol)	Grupo III (Grupo com adição de própolis)	Grupo IV (Grupo com adição de álcool)
24	1,4 10	5. 10	6,0 10 *	1,3 10
48	1,6 10	-	7,7 10 *	1,6 10
72	2,1 10	-	8,0 10 *	1,9 10
96	2,5 10	-	8,3 10 *	2,1 10

* ausência de pseudohifas

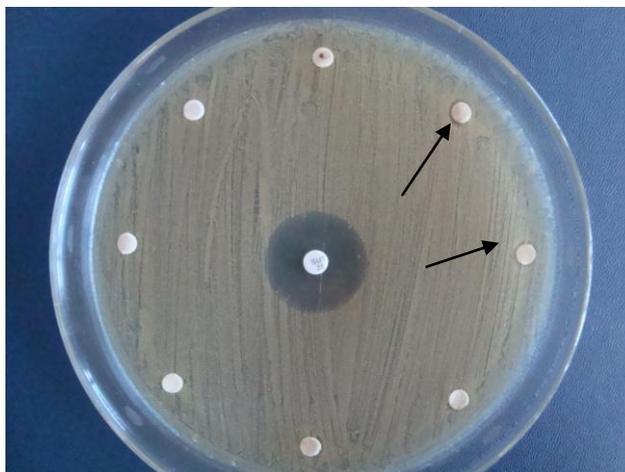


Figura 1- Discreto halo de inibição para *S aureus*

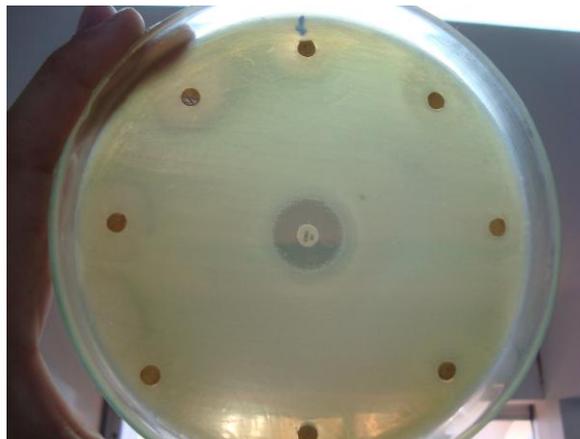


Figura 2- Halo de inibição de 18 mm para *P. aeruginosa*

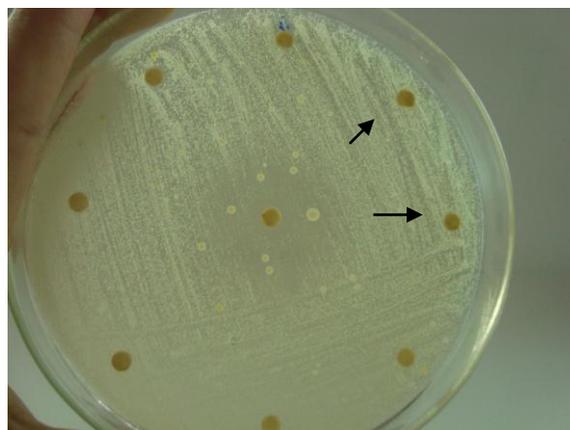


Figura 3- Discreto halo de inibição para *C. albicans*

A dosagem de flavonóides totais identificou 1,22% de quercetina no própolis utilizado nesse ensaio. Esses valores são semelhantes aos identificados por LONGHINI et al. (2007).

6- DISCUSSÃO

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001). O própolis tem sido usado de modo empírico por diferentes populações há muito tempo (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Inúmeros estudos científicos tem demonstrado que o própolis possui grande potencial terapêutico, principalmente efeito antiinflamatório e antimicrobiano (GACS et al., 1993; HENZE et al., 1998; MENEZES, 2005).

Esse estudo avaliou o efeito inibitório do própolis, preparado em solução etanólica, em diferentes concentrações, sobre cepas de bactérias e *C. albicans*. Foram realizadas as técnicas de difusão em disco e de macrodiluição também para a levedura. O método de diluição em disco (Método de *Kirby-Bauer*) é o mais utilizado pela facilidade de execução. Baseia-se na inibição de crescimento do microrganismo na superfície do meio de cultura previamente inoculado e o disco de papel impregnado pela substância a ser avaliada. Após os testes preliminares, optou-se pelo ágar BHI (*Braim-Heart infusion*), utilizado em camada de até 0,4 mm. Essa quantidade de meio é a mais indicada, em quantidade maior ou menor pode interferir no crescimento do microrganismo ou na dissolução da substância avaliada (MOURA, 1998; PINTO et al., 2003). A utilização da técnica de disco oferece a vantagem de facilidade de realização e leitura e também acarretar menor custo de execução, quando comparado com a macrodiluição.

A técnica de macrodiluição é considerada a mais indicada por utilizar meio líquido RPMI. Esse meio de cultura apresenta menor teor de íons Ca e Mg que os meios sólidos normalmente utilizados na técnica de disco. Esses íons podem comprometer o resultado das análises ao se associarem ao produto testado e comprometer sua solubilidade e atividade, além de conter antibióticos que naturalmente podem inibir o crescimento da bactéria testada (MOURA, 1998).

Não se observou efeito inibitório considerável do própolis sobre as cepas de bactérias. Isso pode ter ocorrido por falta de atividade antimicrobiana do produto, devido as concentrações utilizadas ou mesmo pela baixa concentração de princípio ativo no própolis testado nesse ensaio. Mesmo assim, devemos considerar que ao se utilizar uma cepa de bactéria ou fungo, podemos encontrar em um mesmo inóculo células resistentes e sensíveis ao produto, e isso prejudicar a leitura do teste ou mascarar o resultado. Para controlar esse problema, BARRY & THORNSBERRY (1991); SAHM & WASHINGTON II (1991), recomendam que a preparação do inóculo nos métodos de diluição e difusão deve ser feita a partir de quatro ou cinco colônias da cultura do microrganismo.

Ao se avaliar efeito inibitório do própolis sobre *C. albicans* pela técnica de macrodiluição em tubo, observou-se discreto crescimento do número de leveduras, mas evidente ausência de formação de pseudohifas. A formação de pseudohifas é associada com condições ideais de crescimento da levedura e quando detectado in vivo identifica doença por *Candida*. O fato do tratamento com própolis ter inibido a formação de pseudohifas pode indicar ou sugerir um potencial uso do própolis no tratamento da candidíase, principalmente a vaginal recorrente.

Muitos estudos tem sido realizados, com diferentes metodologias, com a finalidade de se identificar o efeito inibidor da substância no crescimento da levedura. Os resultados são contraditórios, mas autores como KOO et al., (1999), HEGAZI et al., (2001), e mais recentemente FERNANDES-JUNIOR et al., (2003) também demonstraram essa atividade inibitória. Em função dessa evidência, FERNANDES JUNIOR et al. (2006), sugerem maior atividade fungistática do que fungicida da própolis.

O mecanismo da atividade antimicrobiana do própolis parece depender do sinergismo entre os flavonóides, hidroaldeidos e sesquiterpenos da composição química do própolis (KROL et al., 1993). A proporção dessas substâncias dependem da época e local da coleta, deste modo a origem geográfica do produto influi na sua atividade terapêutica (STEPANOVIC et al., 2003; PARK et al., 2002; FERNANDES-JUNIOR et al., 2003), mas

contradizendo essas informações, LONGHINI et al., (2007), relatam que talvez essas condições possam não interferir na atividade inibitória de crescimento de microrganismos pelo própolis.

Essa variação na composição do própolis pode explicar os resultados divergentes do seu efeito antifúngico. Alguns trabalhos têm indicado que o própolis apresenta baixa toxicidade, descrevendo inclusive suas doses toleráveis (BURDOCK, 1998). Neste estudo foi determinado a concentração de quercetina no própolis com o propósito de verificar a concentração de princípios ativos que pudessem qualificar o produto utilizado. Quercetina é um flavonóide natural do própolis com propriedades farmacológicas, descritas como antiinflamatório, anticarcinogênico, antiviral, antioxidante (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002)

A Farmacopéia Brasileira (2004) ou outros Compêndios oficiais ainda não contemplam as especificações técnicas de qualidade para a grande maioria das tinturas e extratos fluidos vegetais, assim, cabe ao fornecedor, às indústrias farmacêuticas ou farmácias magistrais a determinação dos teores de princípios ativos desejados no insumo. O Ministério da Agricultura determina para o própolis, o teor de 11% p/v de extrato seco no mínimo, e de 2,3 mg/mL de flavonóides totais expressos em quercetina (equivalente a 0,25% m/m). Nesse estudo, a concentração de quercetina foi de 1,22 %, concentração inferior a concentração proposta como ideal pelo Ministério da Agricultura, mas em conformidade com as concentrações indicadas por outros estudos. Essa quantidade menor pode ser a causa de poucas concentrações se mostrarem inibidoras de crescimento de *S. aureus* e *C. albicans* e nenhuma inibir *P. aeruginosa*.

Essa concentração reduzida de quercetina no própolis utilizado nesse estudo pode ser decorrente de baixa concentração de flavonóides no própolis obtido nessa região do Estado de São Paulo, ou porque a sua concentração diminui gradativamente com o passar do tempo, desde sua obtenção. Isso também precisa ser sistematicamente avaliado, bem como, como fazer para sua conservação satisfatória.

Apesar de considerar a baixa concentração de quercetina no própolis utilizado nesse ensaio, a utilização de concentrações maiores de propolis nas diluições poderiam ter oferecido maior atividade inibitória para *S. aureus* e *C. albicans*.

Como o própolis parece não ser tóxico para o ser humano (NIKULIN et al., 1979), sua atividade antifúngica e antimicrobiana deve ser sistematicamente avaliada *in vitro* e *in vivo* até se tornar efetivamente alternativa de tratamento, principalmente quando de candidíase recorrente ou de resistência de resposta a medicação padrão. E tão importante quanto determinar sua atividade antimicrobiana, deve-se padronizar adequado modo de uso e conservação do produto.

A despeito do uso empírico e indiscriminado, corre-se o risco de perder seu potencial terapêutico, devido à possibilidade de desenvolver microrganismos resistentes.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O própolis apresenta potencial atividade inibitória de crescimento de bactérias e fungos.
- Através dos estudos realizados, observou-se que o própolis acarreta redução no crescimento de leveduras do gênero *Cândida in vitro*, sugerindo assim, seu uso como substância terapêutica no tratamento e alternativa complementar no combate antifúngico da candidíase vaginal, principalmente na doença recorrente, e uma diminuição no uso de antifúngicos clássicos.
- É necessário avaliar a composição química do produto e o modo adequado de conservação, para que seus componentes químicos e suas propriedades farmacológicas não se percam após sua obtenção.
- A metodologia utilizada pode interferir no julgamento de poder inibir o crescimento do microrganismo, pois o método de disco mostra inibição de crescimento e na técnica de macrodiluição é possível verificar além da diminuição de crescimento, redução na formação de pseudohifas,
- Neste estudo observou-se redução na formação de pseudohifas de *C. albicans*, indicando efeito satisfatório de inibição de crescimento da levedura.
- Não se observou significativo poder inibitório do própolis sobre as cepas de bactérias avaliadas.

7.0- REFERÊNCIAS

AMOROZO, M. C. M. **Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Botanica. Brasilica.*** Vol.16, p.189-203, 2002.

BERRETA, ^a H. de O. **A Avaliação da qualidade de insumos farmacêuticos a base de calêndula e própolis utilizados pelas farmácias magistrais** Quality evaluation of marigold and própolis pharmaceutical ingredients used by Magistry Pharmacy. *Revista eletrônica de Farmácia* Vol. IV(2), 169-174, 2007.

BANKOVA , C R, POPOV S, MARCUCCI MC, TSVETKOVA I, KUJUMGIEV A . **Antibacterial activity of essencial oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia.*** p.190-193,1999.

BANSKOTA, A.H. et al. Review article – **Recent progress in pharmacological research of propolis.** Vol.15, p.561-571, 2001.

Braga, C. **Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against Oral anaerobic bacteria; *J. Ethnopharmacol.*** 80, 1–7,2002.

BOSIO, K. et al. **In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes.*** *Lett Appl Microbiol.* Vol.31, n.3, p.174- 177, 2000.

BARRY, AL. Thornsberry C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ. **Manual of clinical microbiology.** 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125.1991

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa n. 3 – ANEXO IV **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2001.

BOSIO, K. et al. **In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes***. *Lett Appl Microbiol*. Vol.31, n.3, p.174-177,2000.

BURDOCK G.A. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)**. *Food Chem. Toxicol.*36,347-363,1998.

CAPASSO F, CASTALDO S . **Propolis, an old remedy used in modern medicine**. *Fitoterapia* 73: S1-6 CATEF 2005. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos. 2002.

CARDOSO, J. L. C., F. O. S. FRANÇA, F. H. WEN, C. M. S. MALQUE e J. V. HADDAD. **Animais Peconhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp.2003.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. **Propolis, an old remedy used in modern medicine**. *Fitoterapia*, Vol.73, suppl.1, p.S1 – S6, 2002.

CRUZ-LANDIM, C. e F. C. ABDALLA. **Glândulas Exócrinas das Abelhas**. Ribeirão Preto, FUNPEC-Editora.(2002).

DAVIS, B D. *Microbiologia*. São Paulo: Harpwr & Row do Brasil, Vol.14,1979.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA: 4º. Edição. Parte 1. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA ALEMÃ: 3 Edição. Parte 2. Deutches:1978

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. **Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellifera* preparados com diferentes concentrações de etanol como extrator**. *Rev Ciênc Farm*, Vol.24, n.2, p.147–152, 2003.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. **In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections**. *J Venom Anim Toxins*, Vol.1, n.2, p.63-69, 1995.

FERNANDES JÚNIOR A, LOPES MMR, COLOMBARI V, MONTEIRO ACM, VIEIRA EP. **Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil.** Ciênc Rural.

FORTE, W.C.N. **Imunologia do básico ao aplicado.** 2 edição; São Paulo, Artes médicas,2007.

GACS, M.; HUSZENICZA, G.; KEG, T.; VIGH, Z.; STOLLAR, Z.; OLAH, O.; JONSSON. J.; O PPEL, K. **Experiences on the effectiveness of an intramammary infusion without containing antibiotics .1. Incidence and clinical-features of mastitis with different bacteriological backgrounds on 7 largescale dairy farms.** *Magyar Allatorvosok*, v.48, n.8, p.473- 478, 1993.

GALES, AC, Reis AO, Jones RN. **Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxyn B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines.** *Journal of Clinical Microbiology* 39: 183-190, 2001.

GHANNOUM, MA, RICE, LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these

mechanisms withbacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 501-517, 1996.

GHISALBERTI, E.L. **Propolis: a review.** *Bee World*, v.60, n.2, p.59-84, 1978

HEGAZI, AG and ABD, El Hady FK. Egyptian **propolis:Antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt Propolis,***Z.Naturforsch*,2001.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J.Flavonoid antioxidante:chemistry and structure activity relationships. *J.Nutr.Biochem*.Vol 13,p 572-584.2002.

HEINZE, W.; HOLZ, J.; NATTERMANN, H.; BLANKENSTEIN, P. **Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance.** *Tierarztliche Umschau*, v.53, n.6, p.321-326, 1998.

JAWETZ, E, MELNICK J, ADELBERG E. **Microbiologia médica** 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p.15-17, 1998.

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

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

KLOTZ, SA, SMITH RL. **A fibronectin receptor on *C. albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix**. *J. Infec. Dis.*, 163:604-610, 1991.

LACAZ, C.S. *Micologia Médica*. 3 Ed. São Paulo: Sarvier, 1986.

LI, XZ; BARRE, N; POOLE, K. **Influence of the MexA-MexB-*oprM* multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-*oprJ* and MexE-MexF-*oprN* multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa***. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 46:885-893, 2000.

LIVEMORE, DM. **Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?** *Clinical Infectious Disease* 34:634-640, 2002.

LIMA, P. R. e BROCHETTO-BRAGA, M.R. **Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera***. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 9(2), 2003.
LOIRISH, N.; ***As Abelhas: Farmacêuticas com Asa***. Editora Mir: Moscou, p. 228. 1998.

Longhini R; RAKSA Sheila.M **.Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica;** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007

MARKHAN et al. **Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis.** *Fitoterapia* 70: 187-189.1996.

MASUDA, N, OHYA S. **Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Antimicrobial and Agents Chemotherapy* 36: 1847-1851, 1992.

MATSUNO, T.CHEN . **Ação inibitoria dos compostos de própolis da *Apis Mellifera* em culturas de *Staphylococcus Aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* .**Vol.25, p.583-584),1997.

MENEZES, H.; ALVAREZ, J.M.; ALMEIDA, E. **Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts.** *Arzneimittelforsch*, v.49, p.705-707, 2005.

MIMS,C. **Microbiologia Médica.**3.ed.Rio de Janeiro:Elsevier,2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

MOURA, R.A.; WADA,C.S; PURCHIO,A.; Almeida T.V.Editora Atheneu 3 edição **Técnicas de laboratório** SP.1998.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J. FREITAS, P.C. et al. **Antibacterial activityof plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria.***Brazilian Journal of Microbiology.* Vol. 31, p.247-56. 2000.

NIKULIN, IM; LISITSYNA, L. Ia; TIKHONOV, AI; SHCHERBINA VD, STEBLUK PN. **Rimnenie propolisa pri vospalitel'nykh zabolevaniiakh dykhatel'nykh puteĭ.,** *Zh Ushn Nos Gorl Bolezn*Nov–Dec;(6):9–12.1979.

OLIVEIRA & BERRETTA. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** *Quím.*

Nova. vol. 32, n.3, pp. 689-702.2007.

PARK, Y. K. et al. **Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal.** *Ciência Rural*, Vol.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PEDROSA, T.M.G. & COUTO, R.C. **Prevenção de infecção em terapia intensiva de adultos e pediátrica.** 1999.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2. ed. São Paulo: Makron Books, Vol. 2.1996.

PENNA C, Marino S, VIVOT E, CRUAÑES MC, MUÑOZ JD, CRUAÑES J, FERRARO G, GUTKIND G, MARTINO. **Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*.** *J Ethnopharmacol* 77:37-40;2001.

PIETTA, P.G. et al. **Analytical methods for quality control of propolis. Fitoterapia.** Vol.73, suppl.1, p.S7-S20, 2002.

PINTO, TJA, KANEKO TM, OHARA MT. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.2003.

PINTO, M.S. et al. **Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite.** *Braz J Vet Res Anim Sci*, Vol.38, n.6, p.278-283, 2001.

Rubim , E. **Patologia** 3ª ed Rio de Janeiro Guanabara Koogan,2002. SAHM DF, WASHINGTON II JA. **Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods**. In: Balows, A.; Hauser, W.J.; Hermann, K.L.; Isenberg, H.D.; 1991. SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1105-1116.

SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, Vol.73, n.1-2, p. 43-249,2000.

STEPANOVIC, S. et al.**In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs**. *Microbiologia Res*. Vol 158,n.4,p 353-357,2003.

TAVARES, JP; MARTINS, IL; VIEIRA, AS; LIMA, FAV; BEZERRA, FAF, 2000. MORAES,MO, Moraes MEA . **Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis**.*Rev. Bras. Farmacognosia* Vol 16,p.350-356,2000.

WILLIAMS R.J., SPENCER J.P, RICE-EVANS. C. **Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?** *Free Radical Biology and Medicine*, v.36, n.7, p.838-849, 2004.