

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS FRENTE A ISOLADOS DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA DE OTITE CANINA

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE PROPOLIS EXTRACT FRONT OF *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVE OF CANINE OTITIS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL FRENTE DE EXTRACTO DE PROPOLIS DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO DE OTITIS CANINA

MACHADO, G.^{1*}; CARDOSO, R.L.²; MABONI, F³; VARGAS, A.C.⁴

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública. Independente da origem da resistência, o fato é que o número de novos microrganismos resistentes em animais e humanos cresce mais rápido do que o desenvolvimento de novas drogas. Portanto, a busca de terapias alternativas é imperativa. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração bactericida mínima (CBM) do extrato de própolis, substância natural elaborada pelas abelhas a partir de resinas de broto, exsudatos e outras partes do tecido vegetal, conhecida pelas suas propriedades antimicrobianas e curativas, frente a 24 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva de otite canina. A CBM, do extrato de própolis, frente aos isolados microbianos, foi determinada utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. A CBM média foi de 23,2 mg mL⁻¹, variando de 10,7 à 42,8 mg.mL⁻¹, sendo esta determinada como a menor concentração do extrato alcoólico de própolis em estudo, capaz de inibir o crescimento bacteriano, estas concentrações testadas demonstram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus* coagulase positiva. O presente estudo demonstrou o potencial antimicrobiano do extrato de própolis testado contra esse agente, em níveis compatíveis aos aceitáveis em testes e também em preparações de pomadas medicamentosas no controle de infecções.

Palavras-chave: Própolis, Resistência, Terapia alternativa.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is real serious problem on the clinical view and public health. Independent of the resistance source, the fact is that the number of new resistant microorganism on animals and human increase faster than the development of new drugs. Therefore, the search of alternative therapy is imperative. The objective of this study was evaluate the minimal bactericide concentration (CBM) of the propolis extract, natural substance elaborated by bees from bud resin, exudates and others

1* - Acadêmico, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Prédio 44, sala 5137, CCR, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS. Email: gustavoetal@gmail.com .

2 - Médico Veterinário, Mestrando no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Prédio 44, sala 5137, CCR, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS.

3 - Médico Veterinário, Mestranda, Laboratório de Fixação Biológica do Nitrogênio do Centro de Biotecnologias (CBiot) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS.

4 - Médico Veterinário, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Prédio 44, sala 5137, CCR, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS.

vegetal parts, well known from their antimicrobial and curative properties, against 24 of *Staphylococcus* coagulase positive isolates of canine otitis. The (CBM), of the propolis extract, against the microbial isolates, was determined using microbroth dilution method. The CBM value was 23.2mg mL⁻¹ with variation of 10.7 to 42.8 mg mL⁻¹, being it determined as the lower propolis alcoholic extract concentration on study, able to avoid bacterial growth, those concentrations tested demonstrated antimicrobial activity for *Staphylococcus* coagulase positive. These present study demonstrate the antimicrobial potential of propolis extract tested against this agent and also on levels compatible to those acceptable for testing and for the preparation of medicinal ointment on infections control.

Key-Words: Propolis, Resistant, Alternative therapy.

INTRODUÇÃO

A perspectiva do uso de antimicrobianos no futuro é incerta, devido ao grande aumento da resistência microbiana. A origem da resistência pode ser genética ou não e, independente de qual seja a forma de maior importância neste processo, o fato é que o número de novos microrganismos resistentes em animais e humanos cresce mais rápido do que o desenvolvimento de novas drogas. O emprego indiscriminado e prolongado destas substâncias químicas sintéticas determina a seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes, tornando o uso de compostos de origem natural uma opção eficaz e econômica (BANKOVA et al., 2005). Assim, terapias alternativas que minimizem além da resistência microbiana, os efeitos colaterais destes medicamentos, estão sendo usados com grande intensidade na medicina humana, e também vem ganhando espaço na medicina veterinária.

A própolis é elaborada pelas abelhas a partir de resinas de broto, exsudatos e outras partes do tecido vegetal. Os insetos misturam ainda suas enzimas salivares, cera, pólen e materiais inorgânicos para a confecção final deste produto (KUSUMOTO et al., 2001), entretanto, ainda que esse efeito tenha sido relatado, deve-se considerar em sua composição, a fonte botânica que lhe deu origem e conseqüentemente seus efeitos terapêuticos (RAMALHO et al., 2007). Sua composição química depende da localização geográfica e dos tipos de plantas das quais as abelhas se alimentam. A própolis é um composto extensivamente estudado, devido à suas características farmacológicas, destacando-se sua atividade antimicrobiana, antifúngica, antivírica, anticancerígena, antiinflamatória, antioxidante, dentre outras (BANKOVA et al., 2005).

Inúmeras doenças que se relacionam à infecção bacteriana têm apresentado elevado grau de resistência aos antimicrobianos, sendo assim candidatas a terapias alternativas. Dentre essas enfermidades as otites caninas recebem destaque pela sua alta prevalência, sendo responsáveis por até 42% (RAMALHO et al., 2007) da casuística de infecções em caninos. A otite é considerada uma doença multifatorial, relacionada a fatores predisponentes, com o envolvimento de bactérias e fungos. Há uma alta resistência aos antimicrobianos mais comumente utilizados no tratamento dos agentes envolvidos nessa infecção, causada principalmente pelo uso abusivo e incorreto de antimicrobianos gerando taxas, cada vez maiores, de microrganismos

resistentes, dificultando, consideravelmente, a resolução do quadro clínico (LYSKOVA, 2007). Estudos revelaram que 33% dos cães rotineiramente atendidos nas clínicas com otites, possuem uma infecção mista por *Staphylococcus intermedius* e *Malassezia pachydermatis*, sendo que 25% possuem apenas um dos agentes (RAMALHO et al., 2007). Ambos pertencem à microflora da região auricular, porém tornam-se patogênicos quando alguns fatores predispõem à multiplicação acelerada dos mesmos. Visualizando o potencial terapêutico do extrato de própolis frente às otites caninas, este trabalho objetiva avaliar a atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato de própolis para *Staphylococcus* spp. de otite canina, visando determinar a concentração bactericida mínima.

MATERIAIS E MÉTODOS

A própolis utilizada neste trabalho é oriunda da região de Santa Maria, Rio Grande do Sul. O extrato foi produzido conforme INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, de 19/01/2001 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura (maceração a frio de 300g de própolis bruta em 700mL de etanol 70%). A preparação foi então, estocada em temperatura ambiente e protegida da luz por um período de 45 dias, após o qual, extraiu-se o sobrenadante, com o auxílio de um sifão, e este foi mantido em frasco âmbar nas mesmas condições.

Foram utilizados 24 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, provenientes de casos clínicos de otite, previamente identificados. Para obtenção de inóculos, os isolados bacterianos foram cultivados em ágar sangue e incubados a 35°C por 24 horas. Para avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) foram testadas concentrações de 42,8 mg mL⁻¹ à 0,33 mg mL⁻¹ do extrato de própolis. O inóculo microbiano consistiu em uma suspensão bacteriana em solução salina, com concentração celular ajustada pela turvação através de leitura da densidade óptica de 0,40 a 0,45 nm, em espectrofotômetro a 600nm, para obtenção de um desafio de 10⁶ UFCmL⁻¹. Na determinação da CBM foi empregado o protocolo M7-A4 (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS, 1997). Este consistiu na distribuição de 200µL das diferentes concentrações do extrato, 200µL de caldo Müller Hinton (MH) e 10µL da turvação de cada microrganismo em poços de placa de microtitulação. Como controle do veículo utilizado na preparação do extrato de própolis, foi avaliado o crescimento do microrganismo em álcool 70% diluído a 3% em caldo MH. O controle positivo da viabilidade do inóculo foi demonstrado com o uso do caldo MH, sem o extrato, e como controle dos reagentes negativos foi usado o extrato de própolis a 42,8mg mL⁻¹. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após incubação a 35°C por 24 horas, 10µL da mistura de cada poço da microplaca foi semeado em ágar Müller-Hinton Posteriormente, as placas foram novamente incubadas por períodos de 24 e 48 horas objetivando a avaliação da CBM, sendo esta definida como a menor concentração do extrato alcoólico de própolis em estudo, capaz de inibir o crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitos estudos, tanto “in vitro” como “in vivo”, são realizados quanto ao potencial da própolis no tratamento de infecções humanas. Em se tratando de cães, poucos são

os trabalhos demonstrando este potencial. Os resultados obtidos nos testes de determinação da atividade antimicrobiana demonstram a ação bactericida do extrato de própolis (Figura 01).

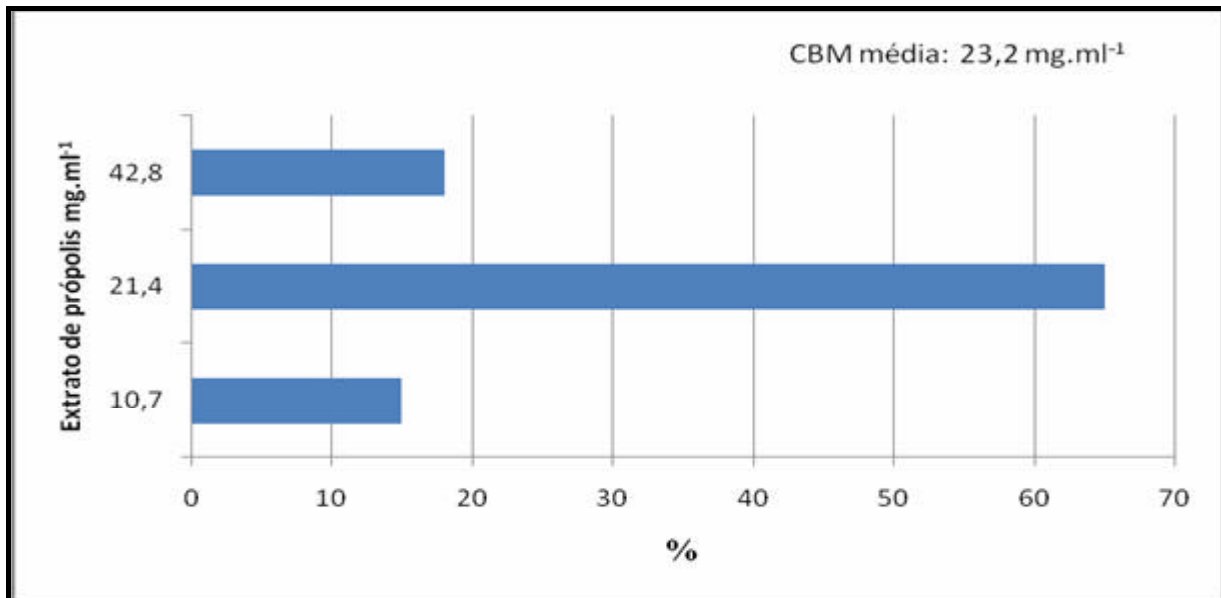


FIGURA 1: Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato de própolis - Distribuição percentual dos 24 isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* de otites caninas.

A CBM média dos 24 isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* testados foi de 23,2mg mL⁻¹, variando de 10,7 a 42,8 mg mL⁻¹. Estes mesmos agentes quando testados "in vitro" por Vargas et al. (1999), frente a 11 antimicrobianos comerciais, usados na clínica veterinária, alcançaram o melhor desempenho de sensibilidade frente a gentamicina, com 81,48% das amostras sensíveis. Apesar da efetividade verificada para gentamicina, suas propriedades ototóxica e nefrotóxica, principalmente em filhotes, a torna inadequada ao uso. Também Kujumgiev et al. (1999), utilizando-se da técnica de difusão em agar, obtiveram a melhor zona inibitória com 0,5 mg de extrato alcoólico de própolis.

Diversos trabalhos tratam da avaliação da atividade antimicrobiana da própolis tanto para bactérias quanto para fungos. Apesar da existência de muitos trabalhos com a própolis, a comparação com outros resultados é prejudicada pela grande diferença entre suas composições. Há intensa variação de uma região para outra, pois é evidenciada grande variabilidade devido a diversidade climática, da flora e entre outros fatores. Sua ação terapêutica é atribuída aos flavonóides e ao ácido ferúlico, que apresentam, principalmente, poder antibacteriano. Estudos comparando a própolis brasileira com a européia têm demonstrado grande variabilidade na constituição (BANKOVA, 2005), e intensa atividade farmacológica da brasileira. A própolis do Brasil é completamente diversa das de outras partes do mundo. Isso se deve a sua composição química diferenciada. A composição é dependente de derivados bioativos, entre eles benzofuranos e benzopiranos (SALOMÃO, 2007).

A avaliação da CBM do extrato de própolis frente ao *Staphylococcus coagulase* positiva apontou concentrações menores ou iguais a $42,8\text{mg mL}^{-1}$ como efetivas para o agente microbiano estudado. Este achado é relevante, uma vez que Bugnotto (2006) determinou esta mesma concentração como sendo a ideal para a manutenção da estabilidade farmacológica do extrato de própolis em preparações medicamentosas, sendo possível deste modo, o desenvolvimento de novos medicamentos no controle de infecções, e conseqüentemente, contribuir com a redução da resistência aos antimicrobianos comerciais.

CONCLUSÃO

As concentrações dos extratos testadas demonstram atividade antimicrobiana para *Staphylococcus coagulase* positiva.

Os resultados obtidos permitem sugerir o emprego do extrato de própolis na composição de medicamentos para o tratamento de otites caninas causadas por esse agente, sendo assim candidato para a preparações de pomadas medicamentosas usadas no controle de infecções.

REFERÊNCIAS

- BANKOVA, V. et al. Recent trends and important developments in propolis research **Evidence-based complementary and alternative Medicine**, v.2, p.29-32, 2005.
- BUGNOTTO, C. **Seleção e avaliação de bases tóxicas com própolis para uso Veterinário**. Trabalho de conclusão de curso. Título de Farmacêutico/Universidade Franciscana, Santa Maria/RS, 2006. 65p.
- LYSKOVA P.; VYDRZALOVA M.; MAZUROVA J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. **Journal Veterinary Medicine**, n.54, p.559–563, 2007.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A4. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1997. 32p.
- RAMALHO, R.M et al. Características clínicas dos casos de otite externa em cães atendidos em Ilhéus/BA e sensibilidade antimicrobiana in vitro das bactérias isoladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.35, n.2, p.423-424, 2007.
- SALOMÃO, K. et al. Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **eCAM Advance Access published**, v.58, p.8, 2007.
- VARGAS, A.C. et al. Avaliação “in vitro” do extrato de Própolis nos agentes causadores de otite e dermatite canina. 14º CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. 1999, Gramado, RS. **Anais**. CD-ROM.
- KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal Ethnopharmacology** Limerick, v.64, n.3, p.235-240, 1999.
- KUSUMOTO, T. et al. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.1207–1209, 2001.