

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA “IN VITRO” DO EXTRATO ETANÓLICO DA PRÓPOLIS VERDE FRENTE À MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO LENTO

SUZANE OLACHEA ALLEND¹; FÁBIA PEIXOTO DA SILVA²; ANDREA VON GROLL²; PEDRO EDUARDO ALMEIDA DA SILVA²; DANIELA FERNANDES RAMOS³

¹ Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil - suzane_olachea@yahoo.com.br

² Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil – fabiapeixoto@gmail.com

² Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil – avongrol@hotmail.com

² Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil - pedrefurg@gmail.com

³ Núcleo de Pesquisas em Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil - daniferamos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos, e o aumento rápido e contínuo desta resistência, tem representado uma ameaça no controle das infecções, pela escassez de alternativas terapêuticas, cada vez mais limitada, cara, e, em alguns casos não existindo drogas eficazes para o tratamento de infecções bacterianas (BRITO; CORDEIRO, 2012). As infecções podem ser causadas por diferentes bactérias, entre elas o gênero *Mycobacterium* que inclui patógenos obrigatórios, oportunistas e espécies saprófitas, e dentre estas, as Micobactérias não tuberculosas (MNT) ditas patógenos oportunistas, que podem ocasionalmente causar doenças graves em seres humanos (CHIMARA et al., 2004). Esses micro-organismos são resistentes aos tuberculostáticos convencionais, o que influencia a resposta terapêutica (CASTRO et al., 1999). Levando em conta, a dificuldade na obtenção de novas drogas com atividade antimicrobiana, a identificação de novos compostos ativos, obtidos de fontes naturais é de suma importância. O uso de produtos naturais tem sido apontado como uma importante ferramenta, devido ao seu amplo potencial tanto para o desenvolvimento de compostos com atividade antimicrobiana quanto à possível atividade inibitória e/ou adjuvante de mecanismos de resistência (CRAGG et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2000; VALGAS et al., 2007; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Dentre os produtos naturais inclui-se a própolis, uma substância utilizada por muitos anos de forma empírica para o tratamento de doenças, e que tem tido o seu potencial farmacológico investigado, principalmente pelas suas atividades antioxidante, antiinflamatórias e antimicrobianas (JÚNIOR et al., 2006). Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimicobacteriana “in vitro” do extrato etanólico da própolis verde frente à *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium kansasii*.

2. METODOLOGIA

A amostra da própolis verde foi obtida pela Nectar Farmacêutica Ltda. em Minas Gerais. As cepas de *Mycobacterium avium* e *M. kansasii* foram mantidas em meio Ogawa-Kudoh durante cerca de 14 dias. As suspensões bacterianas foram preparadas em tubos com água estéril contendo esferas de vidro. Esta foi

homogeneizada por agitação vortex e a turbidez foi ajustada de acordo a escala 1 McFarland ($3,2 \times 10^6$ UFC/mL). O inóculo foi preparado com suspensão bacteriana na proporção de 1:20 em meio 7H9 (Middlebrook) (FRANZBLAU *et al.*, 1998). O método utilizado para a determinação da atividade antimicobacteriana foi *Resazurin microtiter assay* (REMA) (PALOMINO *et al.*, 2002). Na periferia foi adicionado 200µL de água destilada estéril. Acrescentado nos poços de teste, 100µL de meio 7H9 enriquecido com 10% OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase) em cada poço, depois adicionado 100 µ L do extrato etanólico da própolis na concentração inicial de 200 µg/mL, e realizado a microdiluição 1:2, onde as concentrações variaram de 200 µg/mL a 6,25 µg/mL. Após a microdiluição foi adicionado 100 µ L do inóculo bacteriano conforme descrito acima. A microplaca foi incubada por sete dias e após o período de incubação foi acrescentado 30µL de resazurina 0,02% que é utilizada como indicador de viabilidade celular, e incubada novamente por 48horas. Após foi realizada a leitura da placa, onde a CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi definida como a concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os constituintes químicos, bem como a variada atividade exercida pela própolis, em especial a própolis verde, já são descritos na literatura, entretanto, a atividade antimicobacteriana, não é conhecida (STEPANOVIÉ *et al.* 2003; JÚNIOR *et al.*, 2005; ARAÚJO e MARCUCCI, 2011; AL-WAILI *et al.*,2012; WOJTYCZKA *et al.*,2013).

Através da concentração mínima inibitória do extrato etanólico da própolis verde (tabela 1) frente às MNT de crescimento lento (*M. avium* e *M. kansasii*), observou-se que há diferença na atividade antimicrobiana de acordo com a espécie de micobactéria avaliada. Quando avaliado frente a *M. avium*, o extrato não apresentou atividade antimicobacteriana (CIM >200 µg/mL), porém, foi ativo frente a *M. kansasii*, com CIM de 25 µg/mL.

TABELA 1. Resultado Da Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) do extrato etanólico da própolis verde frente a duas espécies micobacterianas de crescimento lento.

| MNT de crescimento lento | CIM do Extrato de própolis µg/mL |
|--------------------------|----------------------------------|
| <i>M. kansasii</i> | 25 |
| <i>M. avium</i> | > 200 |

A atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis tem sido amplamente investigada contra diversas bactérias, principalmente frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (JÚNIOR *et al.*, 2005; MONZOTE *et al.*, 2012), o que indica que possivelmente, a atividade dos extratos da própolis tenha um estreito espectro de ação relacionado a algumas espécies microbianas, principalmente a micro-organismos gram-positivos (STEPANOVIÉ *et al.* 2003; JÚNIOR *et al.*, 2005; AL-WAILI *et al.*,2012; WOJTYCZKA *et al.*,2013). A atividade antimicrobiana encontrada também poderia estar relacionada aos compostos fenólicos que tem sido apontado como um dos principais constituintes da própolis brasileira e como os responsáveis pela atividade bioativa deste produto natural frente a uma série de micro-organismos patogênico (PEREIRA *et al.*, 2002). Além disso,

previamente, foi identificado que a atividade antibacteriana da própolis poderia ser influenciada pela variação de composição química, a qual está intimamente relacionada aos aspectos geográficos, climáticos e a espécie de planta que está associada (Al-Waili et al. 2012).

4. CONCLUSÕES

A atividade antimicrobiana encontrada para o extrato etanólico da própolis verde frente à *M. kansasii* poderia servir como um bom modelo para o desenvolvimento de novos fármacos, capazes de agregar ao tratamento atual desta MNT, possibilitando a introdução de uma nova classe química no arsenal terapêutico, entretanto ainda carecem de pesquisas direcionadas a composição química, atividade e toxicidade *in vitro* e *in vivo*, o qual seria de grande interesse como continuidade deste trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-WAILI, N.; 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**, v. 9, n. 9, p. 793-800, 2012.

ARAÚJO, K. C. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Rev. Pesq. Inov. Farm.**, v.3, n.1, p. 9-14, 2011.

BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidades de novos antibióticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Niterói, v. 48, n.4, p. 247-249, 2012.

CASTRO R. S.; VASCONCELOS O.; HORTA A. A.; RODRIGUES F.; PEREIRA M. F.; ROCHA-MARQUES A. Infecções por micobactérias atípicas. **Agta Médica Portuguesa**. V.12, p. 371-379, 1999.

CHIMARA E.; FERRAZOLI L.; LEÃO S.C. *Mycobacterium tuberculosis* complex differentiation using gyrB-restriction fragment length polymorphism analysis. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**. V.99, n.7, p.745-748, 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p.52-60, 1997.

FRANZBLAU S G, WITZIG R S, MCLAUGHLIN J C, TORRES P, MADICO G, HERNANDEZ A, DEGNAN M T, COOK M B, QUENZER V K, FERGUSON R M, GILMAN R H. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Using the Microplate Alamar Blue Assay. **Journal of Clinical Microbiology** v.36, n.2, p.362-366, 1998.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, n. 3, p. 667-679, 2010.

JÚNIOR, A. F.; BALESTRIN, E. C.; BETONI, J.E.C.; ORSI, R. O.; CUNHA, M. L. R. S.; MONTELLI, A. C. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and

synergism with antimicrobial drugs. **Mem Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.5, p.563-566, 2005.

JÚNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. **Ciências Rural**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

MONZOTE, L.; RUBIO, O. C.; FERNANDEZ, M. C.; HERNANDEZ, I. M.; FRAGA, J.; PEREZ, K.; KERTENS, M.; MAES, L.; COS, P. In vitro antimicrobial assessment of cuban propolis extracts. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.8, p.978-984, Rio de Janeiro, 2012.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G. L. Atividade antibacteriana de extratos vegetais e fitoquímicos de bactérias resistentes aos antibióticos. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, São Paulo, 2000.

PALOMINO J C, MARTIN A, CAMACHO M, GUERRA H, SWINGS J, PORTAELS F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.46, n.8, p. 2720-2722, 2002.

PEREIRA, A. S., SEIXAS, F. R. M. S., AQUINO NETO, F. R. A., Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Quimica Nova**, v.25, n.2, p.321-326, 2002.

STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v.158, p.353-357, 2003.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA Jr., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.369-380, 2007.

WOJTYCZKA, R. D.; DZIEDZIE, A.; IDZIK, D.; KEPA, M.; KUBINA, R.; KABALADZIK, A.; SMOLEN-DZIRBA, J.; STOJKO, J.; SAJEWIEZ, M.; WASIK, T. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, p. 9623-9640, 2013.