

Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo

Antimicrobial activity evaluation of propolis products for sale in São Paulo city

RIALA6/1091

Mariangela Tirico AURICCHIO ^{1*}, Adriana BUGNO ², Adriana Aparecida Buzzo ALMODÓVAR², Tatiana Caldas PEREIRA²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz – Diretoria de Serviço de Medicamentos – SP/SP
Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – e-mail: mauricch@ial.sp.gov.br

²Instituto Adolfo Lutz – Seção de Controle de Esterilidade e Pirogênio – SP/SP
Recebido: 05/06/2006 – Aceito para publicação: 09/01/2007

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa de diferentes origens, com propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, a qual tem sido estudada sob vários aspectos. Neste estudo, nove preparações de própolis comercializadas em farmácias da cidade São Paulo, foram avaliadas quanto à atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. Utilizou-se o método de difusão em ágar, avaliando-se cada produto em condição não diluída, na diluição indicada e em um décimo da diluição recomendada. Os resultados indicaram que as diluições recomendadas nos rótulos dos produtos não evidenciaram atividade antimicrobiana.

Palavras-chave. própolis, atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance from diverse origins with antinflammatory and antimicrobial properties, which has been studied on some aspects. In this study, nine propolis products, sold in pharmacies and drugstores of São Paulo city, were evaluated for their claimed antimicrobial properties displayed in flask labels and/or product use instruction brochures. Antimicrobial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and *Streptococcus mutans*. The method of diffusion in agar was used for evaluating every product in undiluted solutions, in a recommended dilution, and diluted one to tenth of recommended dilution. The results indicated that the recommended dilutions of products showed no antimicrobial activity.

Key words. propolis, antimicrobial activity

INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa balsâmica, de origem botânica variada. Sua coloração varia do verde amarelado ao marrom, tem sabor fortemente acre, frequentemente amargo de odor agradável, que as abelhas extraem dos brotos de arbustos e árvores com a finalidade de calafetar pequenas aberturas na colméia, bem como, purificar e descontaminar o ar internamente a esta. Suas propriedades anti-sépticas e anti-inflamatórias são conhecidas

desde a antiguidade, tendo sido utilizada pelos sacerdotes egípcios em unguentos e cremes para embalsamar, pelos gregos e por outras civilizações estudadas^{1,2}. Apesar de sua utilização ao longo dos séculos, foi nas décadas recentes que se iniciaram as investigações científicas sobre a composição e emprego da própolis.

A composição depende da disponibilidade das fontes vegetais das quais as abelhas retiram o material para sua elaboração e, também da função desejada na colméia, sendo que a própolis usada para reparo da colméia tem proporção maior de cera, resultando

em material mais duro, enquanto que aquela usada para vedar os favos tem pouca ou nenhuma cera, sendo por isso mais macia. As outras substâncias sempre encontradas na própolis são os flavonóides, grupo de substâncias universalmente distribuídos nas plantas, e que indicam a origem da própolis. A composição da própolis no Brasil e suas variações em relação a hidrocarbonetos, ésteres, álcoois de ésteres e terpenos tem sido estudadas^{3,4}.

A atividade antimicrobiana para alguns tipos de própolis também tem sido avaliada e se constituído em objeto de revisões^{1,5-16}.

Neste estudo, preparações líquidas de própolis, comercializadas em farmácias da cidade São Paulo, foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana alegada em rótulos e/ou folhetos que acompanham o produto. As amostras foram submetidas ao teste para verificação da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos frequentemente relacionados a infecções da cavidade bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

Foram avaliadas nove diferentes preparações de própolis, comercializadas em farmácias da cidade de São Paulo: (1) própolis em solução aquosa (27 mg/mL); (2) própolis em solução alcoólica a 12%; (3) extrato alcoólico de própolis a 30%; (4) extrato alcoólico de própolis a 11%; (5) solução alcoólica de própolis a 20%; (6) extrato alcoólico de própolis a 20%; (7) extrato alcoólico de própolis a 15%; (8) própolis em spray e (9) própolis e ervas em spray.

Das nove preparações avaliadas, sete apresentaram-se na forma de solução para serem ingeridas após diluição em água, leite ou suco, de acordo com as indicações do rótulo e embalagem, e duas apresentaram-se como "spray" para serem aspergidas diretamente na cavidade bucal.

Preparação da suspensão microbiana

Culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Candida albicans* ATCC 10321 foram cultivadas em caldo Caseína de soja (DIFCO®), incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, em aerobiose. As culturas de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 foram realizadas em caldo Caseína de soja (DIFCO®), incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, em condições de anaerobiose.

Após cultivo, as suspensões microbianas foram preparadas em solução fisiológica para conterem aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL, baseando-se na escala 0,5 de McFarland¹⁷.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Cada produto foi submetido à avaliação da atividade antimicrobiana utilizando a técnica de Difusão em Agar, de acordo com CLSI¹⁷ (antigo NCCLS).

Preparação das amostras de própolis

Os produtos 1 a 6 foram analisados em três condições: a) sem diluição, b) diluídos em solução fisiológica de acordo com recomendações do fabricante (dose recomendada) e c) em dose 10 vezes superior à dose recomendada. Os produtos 7 a 9 foram analisados sem diluição, de acordo com recomendações do fabricante.

Soluções de eritromicina (na concentração de $1\mu\text{g/mL}$) e de nistatina (nas concentrações de 50 e 30 UI/mL), preparadas conforme indicado em compêndios farmacopêicos¹⁸, foram utilizadas como controle da atividade antimicrobiana.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Alíquotas de $200\mu\text{L}$ de cada suspensão microbiana preparada foi adicionada a $25\mu\text{L}$ de agar Caseína de soja (Merck®), fundido e resfriado, contido em placas de Petri, 90×100 mm. Após a solidificação, foram efetuados seis orifícios com diâmetro aproximado de 10 mm. Alíquotas de $100\mu\text{L}$ de amostra ou solução antibiótica foram adicionadas nos orifícios e as placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, nas mesmas condições descritas para o preparo das suspensões microbianas.

Após o período de incubação, mediu-se o diâmetro dos halos de inibição. A presença de halo com diâmetro igual ou superior a 11 mm foi indicativa de atividade antimicrobiana satisfatória.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as avaliações foram realizadas em quadruplicata e as tabelas 1 e 2 apresentam os diâmetros médios dos halos de inibição.

Entre os produtos avaliados sem diluição, verificou-se que o produto 1 não apresentou atividade antimicrobiana, estando de acordo com outros estudos que evidenciaram que os componentes antibacterianos da própolis são insolúveis em água^{5,15,19}.

A atividade antimicrobiana do extrato de própolis se deve à presença de flavonóides, que são solubilizados em meio alcoólico, além de outros princípios ativos que sinergicamente contribuem para a atividade antimicrobiana^{1,6}. Endler e col.²⁰ demonstraram que a concentração do álcool etílico, utilizado na preparação de extrato de própolis, não apresentou atividade inibitória contra *Pseudomonas* spp e *Staphylococcus aureus*.

A maioria dos relatos menciona que a própolis tem acentuada ação inibitória *in vitro* sobre bactérias gram-positivas^{7-9,12,14-15,20}. A diferença de sensibilidade entre bactérias gram-positivas e gram-negativas frente à própolis pode ser devida às características da composição da parede celular entre os dois grupos de bactérias²¹. No presente estudo, foram utilizadas apenas bactérias gram-positivas, sendo que em relação à atividade antibacteriana, os produtos 2 a 9 exibiram atividade inibitória, quando testados puros, frente aos microrganismos

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de preparações contendo própolis avaliadas sem diluição: halos de inibição de crescimento (mm).

Produto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	16,0 ± 1,7	15,0 ± 2,4	10,8 ± 1,7	14,7 ± 1,5	0,0
3	13,5 ± 1,3	15,5 ± 3,0	14,3 ± 1,5	17,0 ± 1,0	13,0 ± 1,2
4	16,0 ± 2,8	16,5 ± 2,4	0,0	19,7 ± 1,5	12,7 ± 1,5
5	14,5 ± 2,9	16,8 ± 1,6	10,5 ± 1,6	16,5 ± 0,7	11,5 ± 1,3
6	16,5 ± 1,7	17,3 ± 1,0	0,0	17,7 ± 0,6	12,0 ± 0,8
7	16,8 ± 1,5	16,4 ± 1,5	0,0	15,7 ± 1,2	12,3 ± 1,0
8	14,5 ± 2,9	13,0 ± 1,9	0,0	15,3 ± 2,1	10,8 ± 0,5
9	12,5 ± 1,9	11,5 ± 0,8	0,0	15,5 ± 0,7	10,5 ± 0,1
Eritromicina ^a	19,1 ± 1,2	18,6 ± 1,0	15,1 ± 0,9	19,8 ± 0,8	---
Nistatina ^b	---	---	---	---	12,0 ± 0,8
Nistatina ^c	---	---	---	---	17,0 ± 0,6

^a1µg/mL ^b 30 UI/mL ^c50 UI/mL — não realizado

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans*, enquanto que frente a *Enterococcus faecalis*, apenas o produto 3 apresentou atividade inibitória.

Em relação à atividade antifúngica inibitória, verificouse que os produtos 3 a 9 apresentaram halos de inibição menores em relação às bactérias gram-positivas, confirmando os achados de Koo e colaboradores²¹.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos produtos na forma diluída, tendo sido utilizadas diluições para a obtenção de soluções com as doses recomendadas pelos fabricantes dos produtos (D_R) e com dose dez vezes superior à recomendada (D₁). Os produtos 2 a 5, quando avaliados na condição D₁,

apresentam atividade inibitória somente para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*; na condição D_R, nenhum dos produtos apresentou atividade inibitória, evidenciando que os mesmos são utilizados em condições ineficazes para a ação antimicrobiana aludida na rotulagem.

De acordo com a ANVISA, para o registro de produtos com indicação terapêutica que contenham própolis como ingrediente ativo, devem ser atendidos os requisitos da Resolução RDC 132/2003²², dentre os quais estão a comprovação de eficácia e de segurança de uso, bem como apresentar e atender requisitos mínimos de identidade e qualidade validados para possibilitar seu controle de qualidade.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana de preparações contendo própolis avaliadas com diluição: halos de inibição de crescimento (mm).

Produto	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	D ₁	D _R	D ₁	D _R	D ₁	D _R	D ₁	D _R	D ₁	D _R
	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	11,5 ± 0,6	0,0	12,3 ± 0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	11,3 ± 0,6	0,0	13,0 ± 2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	11,0 ± 0,2	0,0	13,0 ± 1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	11,0 ± 0,4	0,0	12,3 ± 1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

D_R = dose recomendada

D₁ = 10 x D_R

Os resultados obtidos neste estudo decorrem da falta de padronização geral das preparações a base de produtos naturais; a adição de excipientes, incluindo os solventes empregados na preparação do extrato de própolis, pode interferir na eficácia antimicrobiana originalmente verificada para a matéria-prima vegetal ativa e comprometer a eficácia do produto final.

A concentração de extrato de própolis, nas sete amostras, variou entre 11 e 30%, enquanto em outras duas, a concentração não foi mencionada.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que as informações no rótulo dos produtos são incompatíveis com a atividade antimicrobiana proposta.

REFERÊNCIAS

1. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 347-63.
2. Almeida EC, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J Venom Anim Toxins* 2002; 8: 191-212.
2. Negri G, Marcucci C, Salatino A. Comb and propolis waxes from Brazil (states of São Paulo and Paraná). *J Braz Chem Soc* 2000; 11(5): 453-7.
3. Soares GDM, Citó AMGL, Lopes JAD, Chaves MH. Triterpenos isolados de própolis piauiense. Disponível em [http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0759]. Acesso em 07/04/04.
4. Astudillo LS, Ávila R, Morrison RA, Gutierrez MC, Bastida J, Codima C, Schimmeda-Hirschmann G. Biologically active compounds from chilean propolis. *Bol Soc Chil Quím* 2000; 45(5): 577-81.
5. Pinto MS, Faria JE, Message D, Cassini STA, Pereira CS, Gioso MM. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001; 38(6): 278-83.
6. Fernandes JR, Lopes CAM, Sforcin JM, Funari SRC. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Venom Anim Toxins* 1997; 3(2):287-94.
7. Fernandes A, Leomil L, Fernandes AAH, Sforcin JM. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and brazilian stingless bees. *J Venom Anim Toxins* 2001; 7(2) :173-82.
8. Fernandes A, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural* 2006; 36(1): 294-7.
9. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 235-40.
10. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA, Braga FC. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 2002; 80: 1-7.
11. Moreno MIN, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. Screening of antibacterial activity of Amaicha del valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 97-102.
12. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa, MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural* 2004; 34(1): 159-63.
13. Bosio, K, Avanzini C, D’Avolio A, Ozino O, Savoia D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol* 2000, 31:174-7.
14. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica* 2002; 43(1-2):187-204.
15. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apodologie* 1995; 26: 83-99.
16. NCCLS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2 – A8, v 23, n 1, 2003. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf]. Acesso em 16/12/2005.
17. United States Pharmacopeia. 28 ed. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2005.
18. Park KY, Ikegaki M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62(11): 2230-2.
19. Endler AL, Oliveira SC, Amorim CA, Carvalho MP, Pileggi M. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. *Ci. Biol. Saúde* 2003; 9(2):17-20.
20. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*, 1994; 60: 222-7.
21. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45:141-8.
22. Brasil, Leis e Decretos – Resolução RDC no. 132 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. Disponível em [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php]. Acesso em 29/03/06.