

SANTOS, José Rubens David dos¹, BARBOSA, Karllisson Victor², SILVA, Dayane dos Santos³,
LIMA, Flávia da Silva⁴

Professor(a) Orientador(a): NETO, Abel Barbosa Lira⁵

Resumo:

A própolis é um composto natural produzido por abelhas e que possui diversas propriedades farmacológicas, como antimicrobiana e anti-inflamatória, pode apresentar variações de cores e composição de acordo com a região de coleta. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito bactericida do extrato da própolis vermelha do Estado de Alagoas frente a cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212. Foram realizadas diluições do extrato bruto da própolis em álcool de cereais 70%, as diluições utilizadas foram 5%, 10%, 15% e 100%, para o controle positivo foi utilizado discos antibiogramas, no controle negativo utilizou-se álcool de cereal 70%, a cepa bacteriana foi semeada em placas contendo ágar Mueller Hinton e os resultados foram obtidos através da medição dos halos de inibição após 24h na estufa bacteriológica a 37°C. Os resultados demonstraram efeito bactericida nas diferentes diluições, sendo os melhores na de 5% e 10%. Concluindo que o extrato da própolis vermelha alagoana possui efeito bactericida frente a cepa bacteriana *E. faecalis*.

Palavras-chave: Antimicrobiana; resistência bacteriana; antibiótico.

Introdução:

A própolis é um produto natural, utilizado pela humanidade há centenas de anos (Vargas *et al.*, 2004). É produzida a partir de resinas, exsudatos e tecidos vegetais aos quais as abelhas acrescentam cera, secreções salivares e pólen. Em função de sua expressiva atividade biológica, tem sido utilizada para fins terapêuticos em humanos e animais (BARRETO, 2020).

A própolis é comumente empregada pelas abelhas como material de construção e selador (LOTFY, 2006). Mantendo a homeostase, reduzindo as vibrações, mantendo o fluxo de ar, defendendo a colônia contra invasores e

¹ Discente do curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Alagoas, E-mail: rubbensjs@gmail.com

² Discente do curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Alagoas, E-mail: karllisson@alunos.uneal.edu.br.

³ Discente do curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Alagoas, E-mail: dayane.silva2@alunos.uneal.edu.br.

⁴ Discente do curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Alagoas, E-mail: flavialima@alunos.uneal.edu.br.

⁵ Docente e pesquisador, Universidade Estadual de Alagoas e Universidade Federal de Alagoas, E-mail: Abel.neto@uneal.edu.br

evitando a putrefação (SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010). É constituído por grânulos de vários tamanhos e tonalidades de cor (amarelo, vermelho e marrom escuro) dependendo de sua origem botânica, enquanto seu cheiro é fortemente aromático (NAGAI *et al.*, 2003).

Os recursos vegetais, a origem geográfica, a estação coletora, as espécies de abelhas e os solventes utilizados na extração influenciam na constituição química, física, biológica e a atividade farmacológica da própolis (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002). Algumas características importantes foram relatadas sobre este produto, como efeitos antimicrobianos e antioxidantes, propriedades anestésicas e outros (MELLO; HUBINGER, 2012).

Diversas substâncias têm sido pesquisadas na intenção de preencher os requisitos de uma solução antimicrobiana ideal (Kasote *et al.*, 2022). O surgimento de resistência antimicrobiana é inevitável para quase todos os novos medicamentos, e é reconhecido como um grande problema no tratamento de infecções microbianas em hospitais e comunidades (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

De acordo com Kayaoglu e Orstavik (2004), as cepas bacterianas *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* podem originar doenças como infecções urinárias e endocardite. A *Enterococcus faecalis*, um anaeróbio facultativo, se destaca por sua resistência ao tratamento endodôntico, capaz de crescer em pH alcalino, sobrevivendo em pH na faixa de 2 a 10, sendo um dos principais microrganismos envolvidos neste processo infeccioso (EVANS *et al.*, 2002).

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a ação bactericida *in vitro* do extrato da própolis vermelha do Estado de Alagoas frente a cepa bacteriana *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212, por meio da leitura dos halos de inibição.

Metodologia:

Trata-se de uma pesquisa experimental *in vitro* realizada por meio de análises microbiológicas utilizando o extrato da própolis vermelha produzida por abelhas *Apis mellifera*, coletada em um apiário localizado na cidade de Porto de Pedras do Estado de Alagoas, onde foi testado frente diversas cepas bacterianas de importância médica, as análises foram realizadas no Polo Tecnológico Agroalimentar de Arapiraca-AL no Laboratório de Microbiologia Clínica e Experimental.

O extrato foi diluído e utilizado nas seguintes porcentagens: 5%, 10%, 15% e 100%, para obter estas diluições primeiro foi feita uma solução mãe, diluindo 1g de extrato bruto para cada 5ml de álcool de cereais 70%, para a solução 5% foi pipetado 250µl da solução mãe, mais 750µl de álcool 70%; para solução 10%, 500µl de solução mãe, mais 500µl de álcool 70%, para 15%, 750µl de solução mãe, mais 250µl de álcool 70% e para a solução 100% utilizou-se a solução mãe.

A bactéria foi semeada nas placas em triplicata. Com a alça de platina foram coletadas colônias de uma placa de Petri já cultivada e diluída em um tubo de ensaio contendo 1 ml de solução salina; foi utilizado um agitador para melhor homogeneizar até atingir 0,5 de turbidez da escala de McFarland. Para semear, utilizou-se *swabs* estéreis, introduzindo na suspensão bacteriana preparada, semeando na placa de Petri de forma uniforme e em cinco sentidos diferentes.

Para o controle positivo foram utilizados discos antibiogramas (CIP/05, GEN/10 e CFZ/30), para o controle negativo utilizou-se 20 µL de álcool de cereal 70% em discos de papel filtro, a cepa bacteriana utilizada foi *Enterococcus faecalis* - ATCC 29 212, proveniente do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), para avaliar a vulnerabilidade da *E. faecalis* aos controles e extrato foi utilizada a técnica de Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA), foram depositados 20 µL de cada diluição em discos de papel filtro de 6 mm de

diâmetro, que foram posicionados com auxílio de uma pinça nas placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton e semeadas com *E. faecalis*.

Os resultados foram obtidos através da leitura dos halos de inibição formados pelo desenvolvimento das colônias bacterianas após o período de incubação, onde ficaram 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica. O estudo faz parte da pesquisa realizada durante o período de participação no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI) 2021-2022, da Universidade Estadual de Alagoas (UNEAL) fomentado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL).

Resultados e Discussão:

Os halos foram analisados com o auxílio de um halômetro, sendo 12 halos das diluições do extrato da própolis, mais 6 do controle negativo e controle positivo, como pode ser observado na Tabela 1; as diferentes diluições do extrato obtiveram variações entre 14 a 20 mm, os dos antibióticos (CP) variaram entre 14 a 30 mm, o CN não formou halo.

Tabela 1. Diâmetros dos halos formados por cada diluição do extrato e os halos formados pelos controles positivo e negativo, frente a *Enterococcus faecalis*.

Repetições		1	2	3
Tipos de controles	CN	0 mm	0 mm	0 mm
	CP	CIP/05 30 mm	GEN/10 16 mm	CFZ/30 14 mm
Concentrações	5%	18 mm	20 mm	14 mm
	10%	20 mm	16 mm	14 mm
	15%	16 mm	14 mm	14 mm
	100%	14 mm	14 mm	14 mm

Legenda: Controle negativo (CN), Controle Positivo (CP), Ciprofloxacina (CIP/05), Gentamicina (GEN/10) e Cefazolina (CFZ/30).

Fonte: Autores, 2023.

Entre os diâmetros dos halos de inibição bacteriana, o antibiótico CIP/05 foi o com maior diâmetro, já o GEN/10 e CFZ/30 formaram halos menores ou

iguais aos de alguns resultados dos extratos, como o de diluição 5%, que obteve halos de 18 e 20 mm ou a diluição 10%, com halos de 20 e 16 mm, maiores ou iguais que o dos antibióticos convencionais frente a uma bactéria considerada de importância médica devido a fatores como a resistência.

De acordo com Paganelli, Willems e Leavis (2012), *E. faecalis* é responsável por várias infecções nosocomiais, como meningite, bacteremia, infecções neonatais, infecções de feridas e infecções do trato urinário, além de está associada a infecções de biofilme. Com o uso generalizado de antibióticos a *E. faecalis* como uma bactéria patogênica emergiu gradualmente com resistência a antibióticos, essas capacidades adaptativas estão intimamente relacionadas com a formação do biofilme.

E. faecalis é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram positiva frequentemente isolada em canais radiculares infectados (SILVA *et al.*, 2010). Dispõe de mecanismos de resistência a agentes químicos, incluindo antibióticos (NACIF; ALVES, 2011). Possui facilidade na transferência de genes que codificam a produção de fatores de virulência: gelatinases, citolisinas, proteínas de superfície de *Enterococcus*, como também substância de agregação de *Enterococcus*, que podem estar relacionados à persistência destes microrganismos (MURRAY, 1998).

A atividade antimicrobiana de produtos naturais atrai cada vez mais atenção, assim como também desperta a busca por tais recursos devido à preocupante e crescente resistência bacteriana aos antibióticos (SOUSA *et al.*, 2019). A própolis é um dos antibióticos naturais que se destaca por apresentar um conjunto de substâncias benéficas em sua composição. Tal como flavonoides, os prováveis responsáveis por sua ação terapêutica, a própolis também possui um baixo custo, podendo ser de fácil acesso para população (LUPION; CAMACHO; NEGRI, 2013).

Diversos estudos semelhantes mostram bons resultados de extratos alcoólicos de diferentes tipos de própolis frente a cepas bacterianas

gram-positivas e gram-negativas, como o estudo de Gomes *et al.* (2016), onde foi utilizado o extrato da própolis marrom frente a diversas cepas bacterianas como *Staphylococcus spp* e *Klebsiella spp*.

Os resultados demonstram que a solução de própolis, seja em concentrações altas ou baixas, pode ter ação comparada ao do controle positivo, como ao próprio hipoclorito de sódio (SIQUEIRA *et al.*, 2014). Esta atividade é atribuída principalmente à flavonoid pinocembrina, flavonoide galangina e ao éster feniletíl do ácido caféico, tendo um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição do RNA-polimerase bacteriano (Uzel *et al.*, 2005).

Neste estudo, o extrato demonstrou ter ação antibacteriana nas diferentes diluições que foram testadas, apesar de que as variações nos tamanhos dos halos por diluições também desperta a atenção, ainda assim, os resultados evidenciam a sua atividade bactericida frente a cepa *Enterococcus faecalis*, bactéria de importância médica responsável por infecções em humanos, onde os menores halos foram de 14 mm o que também foi encontrado no controle positivo CFZ/30.

Conclusões:

O objetivo geral do estudo foi a realização de análises microbiológicas utilizando a própolis vermelha do Estado de Alagoas frente diversas cepas bacterianas de importância médica, onde neste trabalho foi relatado o efeito bactericida frente a *E. faecalis*. Com base nos resultados obtidos, pode-se confirmar a ação bactericida do extrato da própolis vermelha do Estado de Alagoas frente a cepa utilizada. Porém, nos resultados obtidos também foi observado variações consideráveis por diluições, sendo necessário buscar resultados mais uniformes, através de metodologias diferentes do preparo do extrato ou realizar estudos com outras cepas bacterianas. Ainda assim, foram obtidos bons resultados frente a uma importante bactéria, o que sugere um possível recurso antibacteriano em análise.

Referências

- BARRETO, A. L. H.; LOPES, M. D. R., PEREIRA, F. D. M., SOUZA, B. D. A. Controle de Qualidade da Própolis. **Embrapa**, Teresina, v. 268, p. 48, 2020.
- EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **International endodontic journal**, v. 35, n. 3, p. 221-228, 2002.
- GOMES, M. F.; ÍTAVO, C. C., LEAL, C. R.; ÍTAVO, L. C.; LUNAS, R. C. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 279-282, 2016.
- KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300-305, 2017.
- KAYAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.
- LUPION, G. C. A.; CAMACHO, D. P.; NEGRI, M. Avaliação in vitro do extrato da própolis como possível fonte de tratamento para Candidíase Vulvovaginal. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 4, n. 2, p.11-16, 2013.
- MELLO, B. C. B. S., HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 12, p. 2510-2518, 2012.
- MURRAY, B. E. Diversity among multidrug-resistant *Enterococci*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 37-47, 1998.
- NACIF, M. C. A. M.; ALVES, F. R. F. *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Revista brasileira de odontologia**, v. 67, n. 2, p. 209, 2011.
- PAGANELLI, F. L.; WILLEMS, R. J.; LEAVIS, H. L. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm?. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 1, p. 40-49, 2012.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis; 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, v.25, n.2, p.321-326, 2002.
- SOUSA, J. P. L. M.; PIRES, L. O.; PRUDÊNCIO, E. R.; SANTOS, R. F.; SANT'ANA, L. D.; FERREIRA, D. A. S.; CASTRO, R. N. Estudo químico e potencial antimicrobiano da própolis brasileira produzida por diferentes espécies de abelhas. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 5, p. 1480-1497, 2019.
- SILVA, B. M.; TOMAZINHO, F. S. F.; ANELE, J. A.; LEONARDI, D. P.; BARATTO FILHO, F. A ação do hidróxido de cálcio frente ao *Enterococcus*

faecalis nos casos de periodontite apical secundária. **Odonto**, v. 18, n. 36, p. 95-105, 2010.