

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PRÓPOLIS E CERA DE DIFERENTES ESPÉCIES DE ABELHAS SEM FERRÃO

[Propolis and wax antimicrobial potential of different species of bees stingless]

Maria Carla da Silva Campêlo^{1*}, Débora Alves de Carvalho Freire¹, Maria Rociene Abrantes¹, Êlika Suzianny de Sousa², Jean Berg Alves da Silva³

¹ Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN).

³ Docente, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

ABSTRACT – The objective to evaluate antimicrobial activity of propolis and wax different species of stingless bees front of the pathogenic bacteria. Bees wax were collected Canudo (*Scaptotrigona* sp.), Jandaíra (*Melipona subnitida*) and Jati (*Plebéia* sp.), and two samples of propolis species Cupira (*Partamona* sp.) and Jati (*Plebléia* sp). For the analysis of the antimicrobial activity of wax and propolis in hydroalcoholic extracts were produced concentrations of 100, 75 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ and used diffusion technique discs. To evaluate the antimicrobial activity of the extracts were used strains *Enterobacter aerogenes* (ATCC 1304), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). It was observed that the extracts of Canudo bees wax, and Jandaíra Jati showed activity against the tested microorganisms. As for the propolis extracts was verified that the Cupira at concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ had activity against all the tested bacterial strains, as in other concentrations, only *Staphylococcus aureus* was inhibited their growth. The Jati propolis extract inhibited the bacteria *Enterobacter aerogenes* and *Staphylococcus aureus* at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ and *E. coli* suffered no inhibition. So the wax and propolis extracts of bee species assessed sting have antimicrobial potential against strains of microorganisms tested.

Keywords: therapeutic use; antimicrobial action; extract.

* Autor para correspondência. E-mail: carlacampelo2@hotmail.com.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem se realizado uma busca com maior avidez, baseada na biodiversidade de plantas e animais, por recursos genéticos e bioquímicos que possam ser modificados ou que apresentem moléculas bioativas com potencial farmacêutico. Ainda que a maioria das pesquisas seja relacionada à atividade de produtos vegetais, produtos de origem animal têm conquistado espaço, tais como, os originados do metabolismo das abelhas, principalmente o mel, própolis e cera (Bastos et al., 2011).

A própolis, uma resina recolhida por abelhas a partir de várias plantas, apresenta uma grande variedade de efeitos farmacológicos, como antimicrobianos, anti-inflamatórios e de propriedades antitumorais (Sforcin & Bankova, 2011).

A cera de abelhas sem ferrão tem sido pouco relatada em estudos sobre suas atividades biológicas. Ela tem demonstrado propriedades antibacterianas e antifúngicas, sendo utilizada no revestimento comestível de fármacos, de frutas e hortaliças. Também é observado que a cera quente tem obtido ótimos resultados quando aplicada contra inflamações dos músculos, nervos e articulações (Kacaniová et al., 2012; Fagundes et al., 2014).

No entanto, pouco ainda é conhecido quanto às ações terapêuticas da própolis e cera de abelhas sem ferrão. Desta forma objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de própolis e cera de diferentes espécies de abelhas sem ferrão criadas no semiárido brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Para tanto, foram coletadas amostras de cera de três espécies de abelhas sem ferrão, conhecidas como Canudo (*Scaptotrigona* sp.), Jandaíra (*Melipona subnitida*) e Jati (*Plebéia* sp.); e duas amostras de própolis das espécies de Cupira (*Partamona* sp.) e Jati (*Plebéia* sp.) na região semiárida do Brasil. Estas foram coletadas diretamente de meliponicultores. As amostras foram obtidas assepticamente, colocadas em sacos plásticos estéreis, e conduzidas ao laboratório, onde foram mantidas em congelador (- 20 °C) até a produção dos extratos.

Antes de iniciar o processo de extração, as amostras de própolis e cera foram trituradas, pesadas e colocadas em banho-maria a 45 °C por 7 dias. O extrato hidroalcoólico foi obtido por adição do álcool a 70% (v/v) na proporção de 3:7 (m/v) da amostra triturada. Durante os sete dias os extratos

foram vigorosamente agitados por aproximadamente trinta segundos, uma vez ao dia. Após esse período as amostras foram filtradas com papel filtro e os extratos obtidos armazenado em vidro âmbar, de acordo com metodologia descrita por Silva (2003), com adaptações. Foi testado o extrato puro (100 µg/mL) e nas proporções de 75 µg/mL e 50 µg/mL, as quais foram diluídas em água destilada estéril para as amostras de própolis e de cera.

As linhagens utilizadas no estudo foram *Enterobacter aerogenes* (ATCC 1304), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Estas encontravam-se suspensas em caldo *Brain Heart Infusion-BHI*, as quais foram reativadas utilizando o mesmo meio de cultura. O ajuste da turvação da suspensão bacteriana foi realizado utilizando a solução padrão 0,5 da escala de McFarland.

Para verificar a susceptibilidade das cepas bacterianas frente a antimicrobianos convencionais e selecionar o melhor antibiótico para teste subsequente, foi realizado antibiograma pela técnica de difusão em discos. Os testes foram feitos em triplicata pelo método de Kirby-Bauer, utilizando os seguintes antimicrobianos: Amicacina (30 µg), Amoxicilina (20 µg), Ampicilina (10 µg), Cefalexina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Eritromicina (15 µg), Gentamicina (10 µg), Neomicina (30 µg), Oxaciclina (1 µg) e Penicilina G (10 U). As placas foram incubadas invertidas a 36°C por um período de 24 horas, posteriormente, com auxílio de paquímetro foram medidos os diâmetros dos halos de inibição, seguindo como parâmetro de classificação da sensibilidade das cepas a tabela de halos padronizada *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011).

Para o teste com os extratos foi utilizada a técnica de difusão em discos, como método padrão recomendado pelo CLSI (2011), avaliando a ação dos extratos frente às linhagens padrão testadas também no antibiograma. Discos de papel filtro esterilizados foram embebidos com os extratos de própolis e cera das diferentes espécies, nas concentrações testadas (Silva et al., 2006). O controle positivo utilizado foi o antimicrobiano mais efetivo para as linhagens e o controle negativo a água destilada. As placas foram invertidas e incubadas a 36°C durante 24 h. Em seguida, foram medidos os halos de inibição com auxílio de paquímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desta forma, os resultados do antibiograma evidenciaram que a ciprofloxacina foi capaz de inibir com mais efetividade os micro-organismos

testados quando comparado com os outros antimicrobianos, sendo este utilizado como controle positivo nos testes com os extratos de cera e própolis.

Na tabela 1 estão representados os resultados da ação antimicrobiana da cera de abelhas Jati, Jandaíra e Canudo. Todos os extratos testados apresentaram efeito antimicrobiano. Para o extrato de cera de Jati obteve-se ação antimicrobiana em todas as concentrações, com médias de diâmetros

dos halos de inibição variando de 6,3 mm a 7,3 mm.

O extrato de cera de Jandaíra apresentou halo de inibição contra todas as cepas testadas apenas na concentração de 100 µg/mL (Tabela 1). Os resultados obtidos para *E. coli* e *S. aureus* corroboram com Alves et al. (2008), que determinaram o mel de Jandaíra como eficiente no tratamento de feridas infectadas em ratos.

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade de *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* frente a extrato de cera de abelhas Jandaíra (*Melipona subnitida*), Jati (*Plebeia* sp.), e Canudo (*Scaptotrigona* sp.) nas diferentes concentrações.

	Concentração	<i>E. aerogenes</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
Jandaíra	100 µg/mL	7,0	7,0	7,0
	75 µg/mL	6,7	6,7	6,3
	50 µg/mL	6,7	NS	6,3
	CN	NS	NS	NS
	CP	23,0	25,0	29,0
Jati	100 µg/mL	6,3	7,3	7,3
	75 µg/mL	7,7	7,0	6,3
	50 µg/mL	6,3	6,3	6,3
	CN	NS	NS	NS
	CP	27,0	24,0	27,0
Canudo	100 µg/mL	6,3	10,7	8,7
	75 µg/mL	6,3	7,0	6,3
	50 µg/mL	6,7	6,3	NS
	CN	NS	NS	NS
	CP	25,0	22,0	21,0

NS - Não houve formação significativa de halo de inibição; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo.

Em relação ao extrato de cera de Canudo observou-se eficiência no teste. Farnesi et al. (2009) encontrou dados semelhantes para o extrato etanólico de própolis de *Scaptotrigona* sp., o qual inibiu o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*.

A cera de abelha, de forma geral, possui uma constituição extremamente complexa, contendo cerca de 300 componentes diferentes, com concentrações variáveis, os quais podem alterar de acordo com a origem geográfica e climática da cera. Dentre eles, ésteres de ácidos graxos e álcoois são os presentes em maiores quantidades, e todas essas substâncias podem influenciar diretamente na atividade antimicrobiana (Pinzón et al., 2013).

A diferença encontrada entre os extratos de ceras de abelhas sem ferrão pode estar associada a diversos fatores relatados por alguns autores, como: flora, clima, ambiente, composição físico-química, temperatura e os métodos de processamento empregados (Silva et al., 2009; Almeida-Muradian et al., 2013; Cimpoi et al., 2013).

Para o extrato de própolis da espécie Cupira houve formação de halo para os três micro-organismos testados. Para *Staphylococcus aureus* a formação de

halo se deu em todas as diluições. Já as bactérias *Enterobacter aerogenes* e *E. coli* foram inibidas na concentração de 100 µg/mL (Tabela 2).

Em relação ao extrato da própolis da espécie Jati, foi verificado resultados positivos para *S. aureus* e *E. aerogenes* com formação de halo na concentração de 100 µg/mL. Entretanto, para *E. coli* não houve inibição significativa.

Atividade antimicrobiana foi observada também em própolis, pólen e cera de *Apis mellifera* por Kacaniová et al. (2012), que avaliaram a atividade de extratos metanólicos e etanólicos contra bactérias patogênicas, fungos e leveduras. Tendo encontrado maiores halos de inibição para *E. coli*, *Aspergillus niger* e *Candida tropicalis*, para os extratos de cera.

A variação da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis, assim como para cera, pode ser atribuída a diversidade vegetal em que as abelhas coletam seu material para produção de própolis, bem como a estação climática em que os compostos em questão estão sendo produzidos e coletados, uma vez que, a ação antimicrobiana da própolis está diretamente relacionada com os seus constituintes bioativos (Wilson et al., 2015).

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade de *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* frente ao extrato de própolis de Cupira (*Partamona* sp) e Jati (*Plebléia* sp) nas diferentes concentrações.

	Concentração	<i>E. aerogenes</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
Jati	100 µg/mL	7	NS	11,3
	75 µg/mL	NS	NS	NS
	50 µg/mL	NS	NS	NS
	CN	NS	NS	NS
	CP	22	27	27
Cupira	100 µg/mL	7,33	6,6	10,6
	75 µg/mL	NS	NS	8
	50 µg/mL	NS	NS	9,3
	CN	NS	NS	NS
	CP	26	25,3	27

NS - Não houve formação significativa de halo de inibição; CN – Controle Negativo; CP – Controle Positivo.

Al-waili et al., (2012) relata que a atividade sinérgica da própolis associada a diversos antimicrobianos, tem sido bastante estudada nos últimos anos inclusive contra cepas resistentes a benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina, podendo, a própolis, ser uma alternativa terapêutica para a resistência microbiana.

CONCLUSÃO

A análise do potencial antimicrobiano demonstrou que a própolis das espécies Cupira e Jati, bem como a cera das espécies Jati, Canudo e Jandaíra apresentaram atividade contra os micro-organismos testados. Portanto, este estudo tratou-se do primeiro relato referente a atividade antimicrobiana de cera das espécies citadas, contribuindo para um maior entendimento do potencial biológico destes produtos.

REFERÊNCIAS

Almeida-Muradian, L. B., Stramm, K. M. & Estevinho, L. M. 2013. Efficiency of the FT-IR ATR spectrometry for the prediction of the physicochemical characteristics of *Melipona subnitida* honey and study of the temperature's effect on those properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 49: 188-195.

Alves, D. F. S., Cabral Júnior, F.C., Cabral, P.P.A.C, Oliveira Junior, R.M., Rego, A.C.M. & Medeiros, A.C. 2008. Effects of topical application of the honey of *Melipona subnitida* in infected wounds of rats. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 35: 188- 193.

Al-Waili, N.S Al-Ghamdi, A., Ansari, M.J., Al-Attal, Y & Salom, K. 2012. 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*, 9:793-800.

Bastos, E.M.A.F., Galbiati, C., Loureiro, E.M. & Scoari, D.O. 2011. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63: 1255- 1259.

Cimpoiou, C., Hosu, A., Miclaus, V. & Puscas, A. 2013. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. *Spectrochimica*

Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 100: 149-154.

CLSI publication M100-S21 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2011.

Fagundes, C., Palou, L., Monteiro, A. R., Pérez-Gago, M.B. 2014. Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings on gray mold development and quality attributes of cold-stored cherry tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 92:1-8.

Farnesi, A. P., Aquino-Ferreira, R., De Jong, D., Bastos, J.K. & Soares, A.E. 2009. Effects of stingless bee and honey bee própolis on four species of bacteria. *Genetics and Molecular Research*, 8: 635-640.

Kacaniová, M., Vuković, N., Chlebo, R., Hascík, P., Rovná, K., Cubon, J., Džugan, M. & Pasternakiewicz, A. 2012. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Archives of Biological Science*, 64: 927-934.

Pinzón, F. Torres, A. Hoffmann: W. & Lamprecht, I. 2013. Thermoanalytical and infrared spectroscopic investigations on wax samples of native Colombian bees living in different altitudes. *Engineering in Life Sciences*, 13: 520-527.

Sforcin, J.M. & Bankova, V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol*, 133: 253-260.

Silva, E.C.A. 2003. Preparo do extrato de própolis legal. *Mensagem Doce*. 70: 2-3.

Silva, L.R., Videira, R., Monteiro, A.P., Valentão, P. & Andrade, P.B. 2009. Honey from Luso region (Portugal): physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*, 93:73-77.

Silva, R.A., Rodrigues, A. E., Ribeiro, M.C.M., Custódio, A.R., Andrade, N. E.D., Pereira, W.E. 2006. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, 36: 1842-1848.

Wilson, M.B., Brinkman, D., Spivak, M., Gardner, G. & Cohen, J.D. 2015. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US própolis against *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 44-50.