

FACULDADE DE CIÊNCIAS GERENCIAIS DE MANHUAÇU

**Ação Antibiótica da Própolis Sobre Bactérias dos Gêneros
Streptococcus, *Staphylococcus* e *Bacillus* causadoras de
infecção na garganta.**

Cícero Reis Cordeiro

Manhuaçu

2009

Cícero Reis Cordeiro

Ação Antibiótica da Própolis Sobre Bactérias dos Gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* causadoras de infecção na garganta.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Curso Superior de Tecnologia em Gestão Ambiental da Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu, como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo em Gestão Ambiental.

Área de Concentração: Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador (a): Carlos Leandro de Souza Mendes

Manhuaçu

2009

Cícero Reis Cordeiro

**Ação Antibiótica da Própolis Sobre Bactérias dos Gêneros
Streptococcus, *Staphylococcus* e *Bacillus* causadoras de
infecção na garganta.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no
Curso Superior de Tecnologia em Gestão
Ambiental da Faculdade de Ciências Gerenciais
de Manhuaçu, como requisito parcial à obtenção
do título de Tecnólogo em Gestão Ambiental.

Área de Concentração: Trabalho de Conclusão de
Curso

Orientador (a): Carlos Leandro de Souza Mendes

Data de Aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Convidado
FACIG

Prof. Convidado
FACIG

Carlos Leandro de Souza Mendes
FACIG

Manhuaçu

2009

*Aos meus familiares pelo incentivo
que me deram, colegas e
professores.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, meus pais, minha esposa, irmãos e minha família pelo apoio e incentivo que me deram.

A todos que de uma maneira ou outra contribuíram para que eu alcançasse meu objetivo e em especial ao meu orientador.

Aos colegas de curso, professores e amigos pela amizade e carinho que me dispensaram. Deus os recompense e os faça muito felizes.

RESUMO

Ao longo da história, o homem apreendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis administrada sob diversas formas. Embora diversos trabalhos tenham demonstrado o efeito antibiótico da própolis, seus efeitos sobre bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas ainda são raros na literatura, sendo poucos experimentos realizados a fim de comprovar o real poder antibiótico dessa substância para esses grupos de bactérias. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo verificando a possível atividade antibiótica da própolis em relação a bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas. O trabalho foi de caráter experimental e laboratorial com análises quantitativa dos dados. O trabalho foi realizado no laboratório de microbiologia da FACIG onde foram coletadas bactérias causadoras de infecção de garganta de um doador com garganta muito inflamada. Essas bactérias, após a coleta, foram incubadas em meio de cultura contendo própolis a 1%, 2% e 4%. As análises dos dados foram realizadas através de observações de colônias bacterianas após o período de 12h, 24h e 48h, sendo que em nem uma das amostras ocorreu crescimento bacteriano, demonstrando que a própolis é realmente um excelente antibiótico natural e que pode ser utilizado com cautela e com orientações de especialistas e alguns tipos de contaminação bacteriana.

Palavras-chave: Ação Antibiótica, Própolis, Infecção na garganta.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01- Formato e grau de agregação das bactérias.....	17
Figura 02- <i>Streptococcus</i> spp.....	18
Figura 03- <i>Staphylococcus</i> spp.	19
Figura 04- <i>Bacillus</i> spp.	20
Figura 05- Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu (FACIG).....	21
Figura 06- Autoclave.....	23
Figura 07- Pirômetro da Autoclave.....	23
Figura 08- Bandeja da Autoclave e placa-de-petri.....	23
Figura 09- Foto mostrando preparação do meio de cultura.....	24
Figura 10- Foto mostrando Inoculação dos Microorganismos nos Meios de Cultura.	26
Figura 11- Foto mostrando um meio de cultura inoculado por bactéria após 48 horas. A foto demonstra a ausência de crescimento bacteriano...	27
Figura 12- Foto mostrando um meio de cultura não inoculado por bactéria após 48 horas. A foto demonstra a eficiência da esterilização.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01- Número de colônias de <i>Bacillu</i> spp. no grupo controle.....	29
Gráfico 02- Número de colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. no grupo controle.....	29
Gráfico 03- Número de colônias de <i>Streptococcus</i> spp. no grupo controle.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 01- Número de colônias de <i>Bacillu</i> spp. no grupo controle.....	28
Tabela 02- Número de colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. no grupo controle.....	29
Tabela 03- Número de colônias de <i>Streptococcus</i> spp. no grupo controle.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1- PROBLEMA DA PESQUISA.....	11
1.2- JUSTIFICATIVA.....	11
1.3- OBJETIVOS DA PESQUISA.....	12
1.3.1- Objetivo geral.....	12
1.2.3- Objetivos específicos.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1- PRÓPOLIS.....	13
2.2- COMPOSIÇÃO DA PRÓPOLIS.....	15
2.3- PROPRIEDADES ESSENCIAIS DA PRÓPOLIS.....	15
2.4- BACTÉRIA.....	16
2.4.1- Morfologia.....	16
2.4.2- Gênero das bactérias estudadas.....	18
2.4.2a- <i>Streptococcus</i> spp.....	18
2.4.2b- <i>Staphylococcus</i> spp.....	19
2.4.2c- <i>Bacillus</i> spp.....	20
3. METODOLOGIA DE PESQUISA.....	21
3.1- UNIDADE DE ANÁLISE.....	21
3.2- TIPO DE PESQUISA.....	22
3.3- DEFINIÇÃO DE HIPÓTESES.....	22
3.4- PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS.....	22
3.5- ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL.....	22
3.6- PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	23
3.7- COLETA DO MATERIAL.....	25
3.8- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	25
3.9- INOCULAÇÃO DOS MICROORGANISMOS NOS MEIOS DE CULTURA.....	26
3.10- ANÁLISE DOS DADOS.....	27
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
4.1- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	30
4.2- CONCLUSÃO.....	31
4.3- LIMITAÇÃO DA PESQUISA.....	31
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	33

1.1- INTRODUÇÃO

“Ao longo da história, o homem apreendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis” (PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002. p. 322) administrada sob diversas formas. “Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 A.C.; “cera negra”) era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos (PEREIRA, SEIXAS e NETO, 2002. p. 323).

“A própolis é um produto constituído por uma mistura formada por material resinoso e balsâmico coletada pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudados de árvores; além desses, na colméia as abelhas adicionam secreções salivares. (PEREIRA, SEIXAS e NETO, 2002. p. 323).

Nos últimos anos diversas pesquisas têm demonstrado a diversidade de atividade antibiótica, antiviral e anti-helmintos da própolis. “A grande maioria dos relatos mostra que os diversos tipos de extratos possuem acentuada ação inibidora sobre bactérias gram positivas e em menor escala sobre gram negativas” (GRANGE e DAVEY, 1990. p. 159). “Alguns trabalhos têm sugerido que a atividade antibacteriana da própolis possa estar associada ao alto conteúdo de substâncias do tipo flavonóides presentes” (GRANGE e DAVEY, 1990. P. 160).

Segundo Prado Filho, Azevedo e Flechtmann (1962) a substância ativa da própolis é termicamente estável, conservando sua ação antibacteriana mesmo após ser submetida à temperaturas superiores a 100°C por meia hora.

Diversos autores têm concluído que a técnica de extração, a metodologia de condução de ensaios, o local de origem e época do ano em que a própolis foi produzida tem influência sobre o maior ou menor grau de inibição do produto em relação às diferentes espécies de microorganismos (SHUB *et al.*, 1978; MERESTA e MERESTA, 1985; VALDES, RUIZ e MARTIN, 1989; FUENTES e HERNANDEZ, 1990).

1.2- PROBLEMA

Embora diversos trabalhos tenham demonstrado o efeito antibiótico da própolis, seus efeitos sobre alguns grupos específicos de bactérias ainda são raros na literatura, sendo poucos experimentos realizados a fim de comprovar o real poder antibiótico dessa substância para certos grupos de bactérias.

As bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* estão entre as mais comuns em diversos tipos de ambientes, podendo relacionar ecologicamente com o ser humano de três formas (protocooperação¹, comensalismo² e parasitismo³). Dentre as parasitas algumas podem causar pequenos problemas quase imperceptíveis ou levar a pessoa a ter serias sequelas ou até mesmo a morte, como é o caso da meningite meningocócica.

Através do estudo sobre a Gestão ambiental aplicada a microbiologia busca-se responder a seguinte questão: Qual o efeito antibiótico da própolis sobre bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas?

1.3- JUSTIFICATIVA

Conhecer o efeito antibiótico da própolis para bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas, assim como saber também quais os níveis de tolerância dessas bactérias ao produto é uma ferramenta eficiente para indicar o uso da própolis e a dosagem para pequenas infecções bacterianas, evitando assim o uso de antibióticos sintéticos de forma desregulada, o que em longo prazo pode causar seleção natural das bactérias e consequentemente o surgimento das super-bactérias.

¹ Associação bilateral, entre espécies diferentes, na qual ambas se beneficiam; contudo, tal associação não é obrigatória, podendo cada espécie viver isoladamente.

² Associação em que uma das espécies é beneficiada, sem causar benefício ou prejuízo a outra.

³ Associação entre duas espécies onde uma é beneficiada e a outra é prejudicada.

1.4- OBJETIVO GERAL

1.4.1- Objetivo Geral

Realizar um estudo verificando a possível atividade antibiótica da própolis em relação a bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas.

1.4.2- Objetivo Específico

- Avaliar a possível atividade antimicrobiana das diferentes frações de própolis frente a diferentes tipos de bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas.
- Selecionar as frações de própolis que possuem ação antibacteriana sobre bactérias isoladas dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas.
- Avaliar a curva de sobrevivência de bactérias isoladas dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* que causam infecções de garganta nas pessoas às frações extraídas da própolis, com atividades microbianas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1- PRÓPOLIS

“Ao longo da história, o homem apreendeu a utilizar os produtos naturais na medicina, sendo que um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis administrada sob diversas formas” (PEREIRA, SEIXAS e NETO, 2002. p. 322).

De origem grega, a palavra própolis resulta da combinação entre as expressões pró (defesa) e polis (cidade). As abelhas têm na própolis a garantia de assepsia no interior da colméia onde convivem em espaço restrito mais de setenta mil indivíduos com as crias e seu estoque de alimentos (MARCUCCI, 1996, p.532).

“A própolis é uma substância constituída de material resinoso e balsâmico de consistência variada coletado e processada por várias espécies de abelhas do gênero *Apis* a partir de várias fontes vegetais” (BANKOVA, 2005. p. 54). “Devido a sua composição química complexa, sua coloração pode variar do amarelo claro, marrom esverdeado ao negro” (MARCUCCI *et al.*, 2001. p. 107).

Estudos recentes demonstraram que a própolis é uma substância complexa, constituída por mais de trezentas substâncias, com predominância de flavonóides, das quais destacam-se: galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, campferol e quercetina, bem como os aldeídos aromáticos, cumarinas, ácidos fenólicos, ácidos orgânicos e alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, silício, manganês, estrôncio, e vitaminas B1, B2, B6, e C (BANKOVA *et al.*, 2000. p. 10).

Segundo (BURDOCK, 1998, p.350).

As abelhas coletam a própolis de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exsudatos resinosos, e a enriquece com secreções salivares, principalmente, pela presença da enzima glicosidase, responsável pela hidrólise dos flavonóides glicosilados em agliconas.

A composição química da própolis agrega, basicamente, resinas e bálsamos aromáticos (50%), ceras (25% a 35%), óleos essenciais (10%), grãos de pólen (5%), além de compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) minerais e vitaminas (FERREIRA *et al.*, 1996, p. 70).

Park *et al.* (2000) identificaram e classificaram 12 tipos de própolis no Brasil, de acordo com as características químicas deste produto natural.

Preliminarmente, a própolis foi classificada de acordo com sua procedência, ou seja, em função da região onde era coletada. Entretanto, ao se constatar que a própolis de um mesmo tipo - portanto com características químicas similares, poderia ser encontrada em diferentes regiões, passou-se a classificá-la de acordo com o perfil revelado por esse produto através da cromatografia em camada delgada (CCD), e não mais com base no local original da coleta (PARK *et al.*, 2000. p. 88)

“Por apresentar atividades biológicas, a própolis vem sendo utilizada há milhares de anos pelo homem, no período dos faraós a própolis era utilizada para mumificação de cadáveres” (SALTINO, 2005. p. 36), e hoje é amplamente utilizada para tratamento de infecções bacterianas (SFORCIN *et al.*, 2000), fúngicas (MURAD *et al.*, 2002), atividades antiinflamatória (REIS *et al.*, 2000), contra afecções do trato respiratório (TAVARES *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2006), antioxidante (SIMOES *et al.*, 2004), imunomodulatória (SFORCIN, ORSI, BANKOVA, 2005; MISSIMA *et al.*, 2006), antitumoral (BASO *et al.*, 2002) e antiúlcera (BARROS *et al.*, 2006).

“O interesse pela ação farmacológica de produtos naturais tem crescido e encontrado significativa aceitação popular. Dentre esses produtos, a própolis tem se destacado devido à sua aplicabilidade na indústria de alimentos e cosméticos, por ser utilizada como princípio ativo em vários produtos, dentre os quais os dentífricos e os cremes para pele. Isso se deve às suas diversas propriedades terapêuticas” (MARCUCCI, 1995. p. 90).

“Atualmente existem diversos produtos contendo a própolis comercializadas em todo mundo, principalmente no Japão, tais como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções anti-sépticas, pastas de dente, etc” (ACKERMANN, 1991. p. 136).

Estudos *in vitro* demonstram a ação antibiótica e antimicrobiana da própolis frente aos diversos microrganismos patogênicos, inclusive microrganismos bucais de seres humanos. Vários componentes da própolis têm sido analisados em diferentes países, sendo o ácido caféico, o éster fenético, o ácido caféico e os flavonóides os principais responsáveis pelo poder antibiótico desta resina (HAVSTEEN, 1983; MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005).

2.2- COMPOSIÇÃO DA PRÓPOLIS

Na composição da própolis, tais como a geleia real, existem substâncias ainda hoje mal determinadas. Portanto, sua análise química, ainda não é totalmente conhecida. No entanto, podemos revelar algumas indicações relativas a elementos da sua composição, tendo em conta que, se trata de uma “composição” comum, uma vez que, a composição pode sofrer alguma alteração, visto cada espécie de árvore, possui suas próprias qualidades, de acordo (CHEZERIES, 1984). A própolis é composta de:

- Resina: 50%
- Cera: 25 a 30%
- Pólen: 5%
- 5% de substâncias diversas

2.3- PROPRIEDADES ESSENCIAIS DA PRÓPOLIS

As propriedades da própolis têm vindo a ser reconhecidas nas últimas décadas da experimentação do produto. Depois de estudos realizados na Romênia, Rússia, Bulgária, França e Espanha, são possível atribuir à própolis determinado número de propriedades que passamos a enumerar:

Antibacteriana – ou seja, que impedem o desenvolvimento das bactérias e ajudam a sua destruição. Este poder antibacteriano deve-se a substâncias antibióticas, tais como a galangina, prinocembrina e mais recente por substância do tipo flavonoides presentes (GRANCE e DAVEY, 1990). Assim no final do século passado, durante a guerra da Bocus, utilizava-se própolis para cuidar dos ferimentos: em tempo escreve Alin Caillas, quando se desconhecia a existência de antibióticos, se não utilizassem a própolis, colocada diretamente sobre as feridas, a maioria dos feridos morreriam de infecção.(CHEZERIES, 1984).

Anestésicas – o poder anestésico da própolis é muito forte. De fato, ele é 3,5 vezes mais forte que o da cocaína e 52 vezes mais forte que procaína. Além disso o efeito sinérgico da própolis da procaína juntas podem chegar a 14 vezes o da procaína

isolada. Esta propriedade aliada a uma ação cicatrizante e antibiótica faz atualmente deste produto uma arma eficaz nos recursos terapêuticos para tratamento de infecções buço-dentárias, (CHEZERIES, 1984).

Cicatrizantes – na França e Espanha este produto sempre foi utilizado como cicatrizante hoje mundialmente conhecido ela é utilizada nas amigdalites, problemas de gengivas, dor de dente, acne, úlceras, hemorróidas, cortes, tosse, cistite, eczemas, herpes, sinusites, ferimentos etc. Apesar de ter uma utilização paralela às prescrições farmacêuticas clássicas, determinados representantes do corpos médicos se interessam cada vez mais por este produto (CHEZERIES, 1984).

2.4- BACTÉRIA

As bactérias são organismos do Reino Monera, pertencem aos domínios Bacteria ou Aqueobacteria. São organismos constituídos por apenas uma única célula (unicelulares), sem núcleo propriamente dito, ou seja, não possui membrana nuclear/carioteca (são organismo procariontes), nem organelas membranosas. Podem ser encontrados na forma isolada ou em colônias em quase todos os lugares no mundo (PELCZAR *et al.*, 2005).

2.4.1- Morfologia

Segundo Pelczar *et al.* (2005) as bactérias podem ser classificadas morfológicamente de acordo com a forma da célula e com o grau de agregação da seguinte forma.

Quanto a forma:

- **Coco** : Bactérias com forma esférica ou subesférica (do género *Coccus*)
- **Bacilo** : Bactérias com forma de bastonete (do género *Bacillus*)
- **Vibrião** : Bactérias com forma de vírgula (do género *Vibrio*)
- **Espirilo** : Bactérias com forma espiral/ondulada (do género *Spirillum*)

- **Espiroqueta** : Bactérias com forma acentuada de espiral

Quanto ao grau de agregação:

Apenas os Bacilos e os cocos possuem grau de agregação.

- **Diplococo** : Bactérias com forma esférica ou subesférica e agrupadas aos pares (do género *Diplococcus*)
- **Estreptococos** : Bactérias que formam cadeia semelhante a um "colar"
- **Estafilococos** : Bactérias que possuem uma forma aparentemente desorganizada de agrupamento, semelhante a cachos de uva.
- **Sarcina** : Bactérias com forma cúbica, formado por 4 ou 8 cocos.
- **Diplobacilos** : Grupo de bacterias formado por dois bacilos.
- **Estreptobacilos** : Grupo de bacterias formado por vários bacilos alinhados em cadeia.

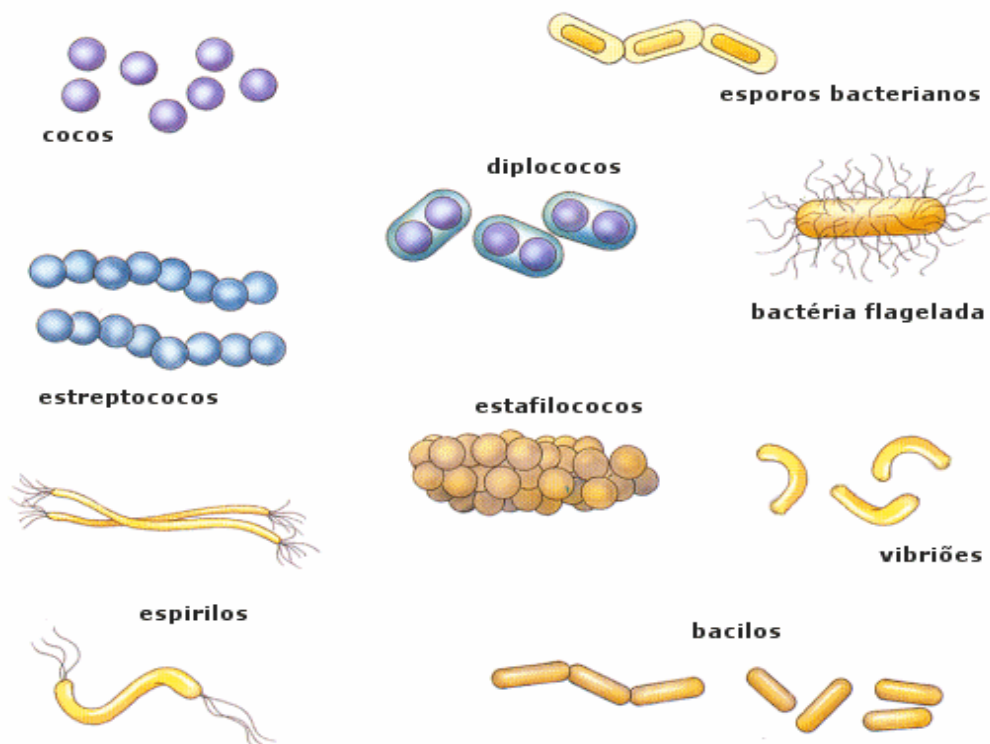


Figura 01- Formato e grau de agregação das bactérias. Disponível em:
<http://www.infoescola.com/files/2009/08/faecimg_monera5.gif>

2.4.2- Gênero das bactérias estudadas

2.4.2a- *Streptococcus* spp.

Os estreptococos são bactérias em forma de cocus cujas dimensões variam entre 0,5 a 1 μm (micrometro). Possuem agrupamento em cadeias enfileiradas semelhante a um colar de pérolas. Em meios sólidos os *Streptococcus* spp. Podem formar cadeias curtas ou aos pares (*Diplococcus*). No caldo, as cadeias podem ser longas ou agrupadas. Algumas espécies possuem cápsula na fase de crescimento logarítmico e estacionária. Podem viver na presença de oxigênio (bactérias aeróbias) ou na ausência de oxigênio (bactérias anaeróbias) (PELCZAR *et al.*, 2005).

Os estreptococos podem ser encontrados na natureza como sendo organismos comensais (vivem em associação com outro ser vivo sem causar doença), patogênicos (causam uma série de doenças nos animais e no homem) e saprófitos (alimentam de produtos realizando a decomposição). Estão presentes na pele e nas mucosas do trato digestivo, genital e respiratório dos seres humanos (PELCZAR, *et al.*, 2005).

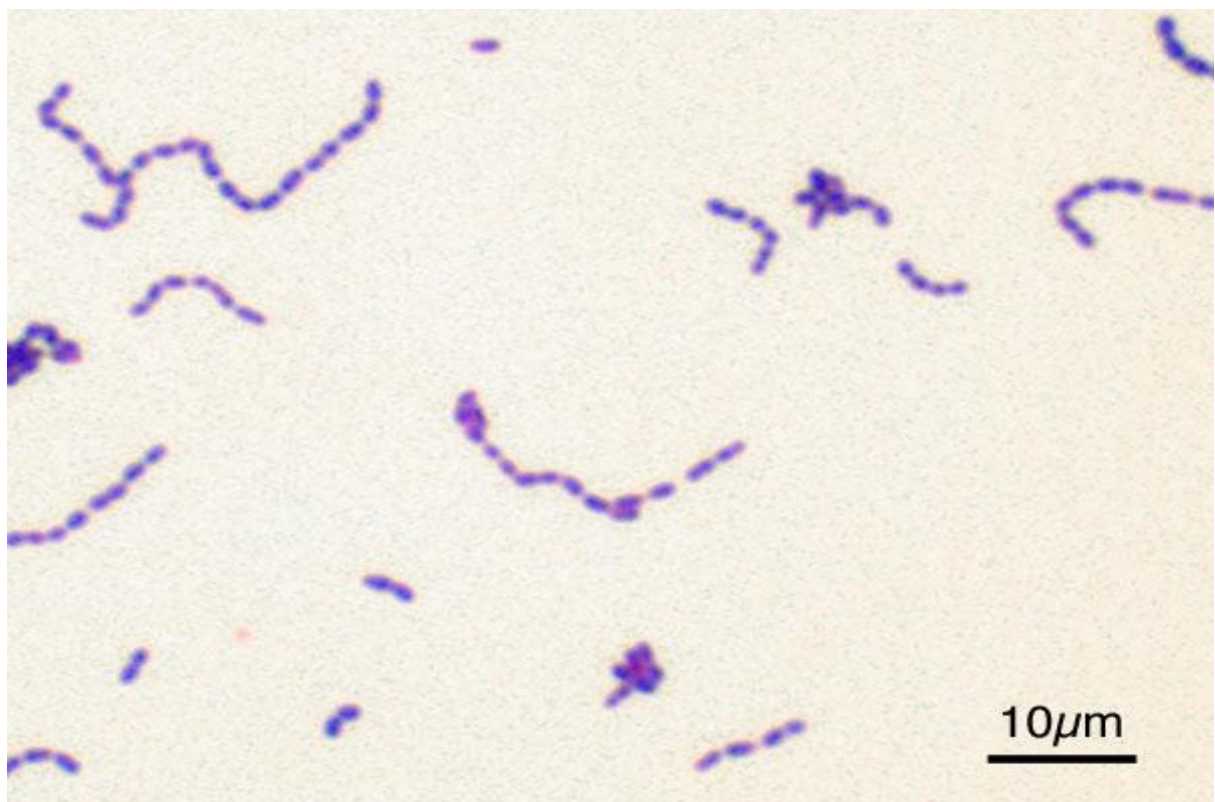


Figura 02- *Streptococcus* spp. Disponível em:
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4d/Streptococcus_mutans_Gram.jpg>

2.4.2b- *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* spp. são um gênero de bactérias com forma de esférica (cocos) e com um agrupamento parecendo um cacho de uva (staphyle é a palavra em grego para cacho de uvas). Diversas bactérias do gênero *Staphylococcus* podem causar doenças no ser humano. Possuem cerca de 1 µm de diâmetro (PELCZAR *et al.*, 2005).

“Os estafilococos são bactérias anaeróbios facultativos, ou seja, podem viver em meios aeróbios, usando oxigênio, ou anaeróbios através de fermentação, mas crescem muito mais rápido aerobicamente. São bactérias destituídas de organelas de locomoção (não possuem cílios nem flagelo).” (PELCZAR *et al.*, 2005. p.117).

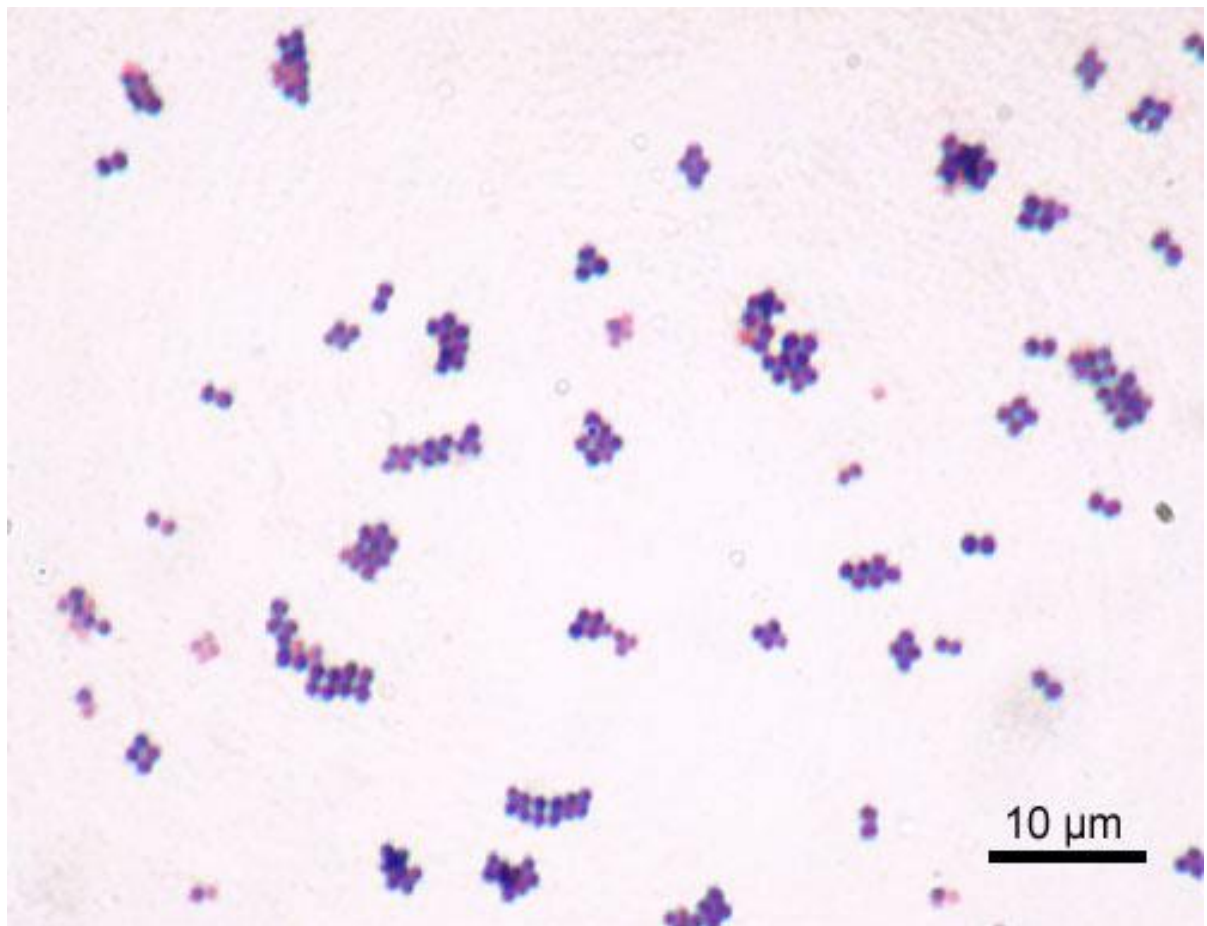


Figura 03- *Staphylococcus* spp. Disponível em:
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Staphylococcus_aureus_Gram.jpg>

2.4.2c- *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias com formato em forma de bastão cujas extremidades podem ser retas ou arredondadas. São bactérias de tamanho variado podendo variar de 0,5 μm a 2,5 μm . Atualmente são conhecidas cerca de 220 espécies e 5 subespécies de bactérias *Bacillus*. Geralmente são organismos móveis graças aos cílios. Algumas espécies possuem uma cápsula protetora. Podem ser aeróbicas ou anaeróbicas (PELCZAR *et al.*, 2005).

Certas espécies do gênero *Bacillus* podem resistir aos procedimentos de limpeza graças ao fato de produzirem esporos que permitem aderir fortemente a diversos materiais. É o caso do *Bacillus cereus* que se aderem muito bem às superfícies de aço inoxidável e que podem causar graves problemas nas indústrias de alimentos (TORTORA; FUNKE e CASE, 2005. p. 110).

A resistência dos esporos constitui um grande problema na medicina. Certas infecções acontecem devido à esporulação e consequente resistência de certas espécies. No campo industrial (indústrias agro-alimentares, indústria farmacológicas produção de material estéril descartável) além do problema de resistência se soma a adesão dos esporos (BURTON e ENGELKIRK. 2005. p. 59)

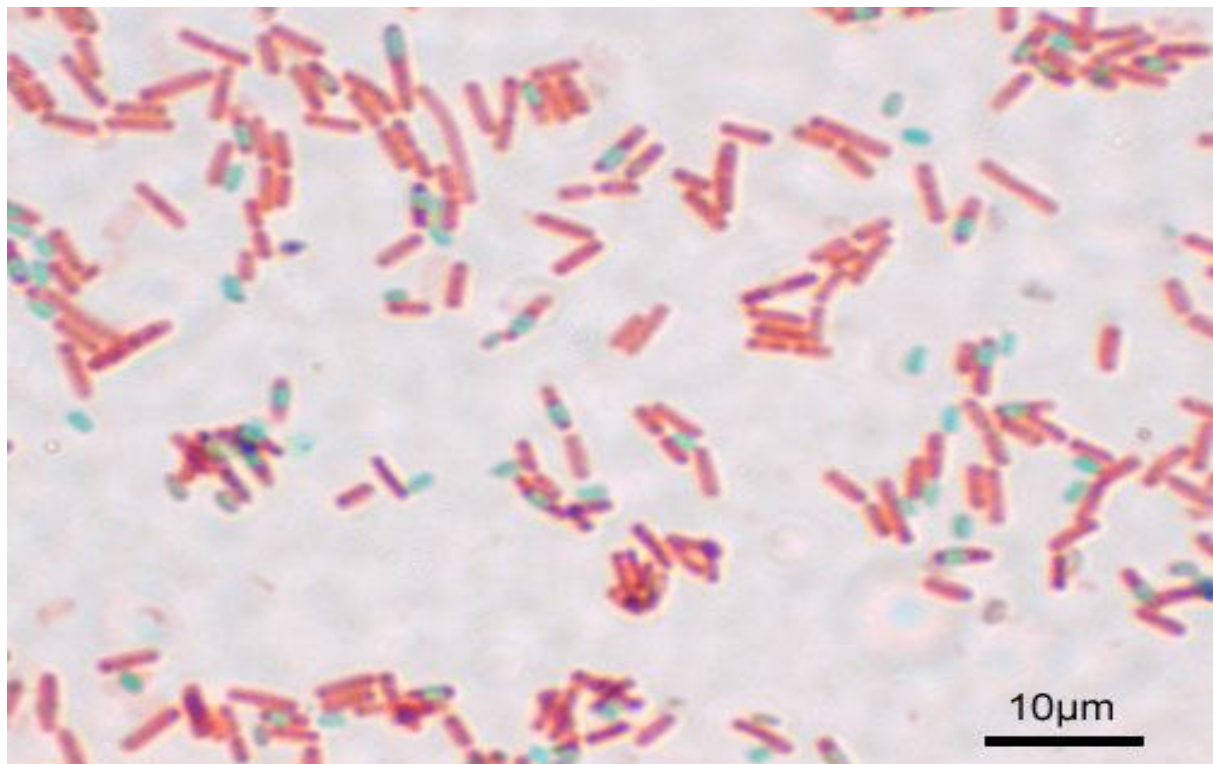


Figura 04- *Bacillus* spp. Disponível em:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7a/Bacillus_subtilis_Spore.jpg>

3. METODOLOGIA

3.1- UNIDADE DE ANÁLISE

O presente estudo foi realizado no laboratório de microbiologia no setor de Gestão Ambiental da Faculdade de Ciências Gerenciais (FACIG) no município de Manhuaçu, Minas Gerais. O trabalho laboratorial foi realizado nos dias 18, 19 e 20 de Setembro de 2009, com um esforço amostral 24 horas laboratoriais.



Figura 05- Faculdade de Ciências Gerenciais de Manhuaçu (FACIG)
Foto: Carlos Leandro.

3.2- TIPO DE PESQUISA

Esse trabalho foi de caráter experimental e laboratorial com análise quantitativa dos dados.

3.3- DEFINIÇÃO DE HIPÓTESES

A hipótese apresentada nesse trabalho é que a própolis é um antibiótico com efeito sobre bactérias causadoras de infecção de garganta nos seres humanos.

3.4- PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS

A amostra da própolis estudada foi colida em colméias a abelhas africanas *Apis mellifera* em uma propriedade rural do município de Manhuaçu-MG. Para preparação da própolis foi colocado 100 ml de própolis bruta em um béquer devidamente esterilizado e adicionado mais 100 ml de álcool de cereais. O recipiente foi armazenado em local fresco e ficou em processo de decantação por um período de 04 a 06 meses, passando esse período o material foi filtrado através de filtro de papel por três vezes. A própolis utilizada neste trabalho possuía cor verde e odor balsâmico agradável.

3.5- ESTERILIZAÇÃO DO MATERIAL

A esterilização do material se deu pelo calor úmido através da autoclavagem do material por autoclave simples. Esse método é atualmente um dos métodos mais eficazes de destruição de microrganismos, uma vez que o calor úmido resulta da desnaturação das proteínas e da desestabilização da membrana citoplasmática dos microorganismos.

O material a ser esterilizado foi adicionado na autoclave à pressão de 1 atm acima da pressão atmosférica, o que corresponde a uma temperatura de ebulição da água de 121°C, durante 30 minutos, de modo a assegurar a morte de todas as formas de

vida bacterianas, incluindo a dos endósporos bacterianos, mais resistentes ao calor que as células vegetativas. Esse método foi escolhido devido ao seu fácil uso e alta eficiência.



Figura 06- Autoclave (Foto: Carlos Leandro)



Figura 07- Pirômetro da Autoclave (Foto: Carlos Leandro)



Figura 08- Bandeja da Autoclave e placa-de-petri (Foto: Carlos Leandro)

3.6- PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Cultura Pura - Para obtenção das culturas puras de bactérias utilizou-se o meio de cultura comercial TSA (Tryptic Soy Agar) por ser um meio de cultura de aplicação generalizada ao crescimento de vários microrganismos e consequentemente não seletivo, onde crescem diversos tipos de bactérias heterotróficas. Esse meio foi obtido misturando as seguintes substâncias:

- Enzymatic Digest of Casein.....15gr
- Enzymatic Digest of Soybean Meal..... 5gr
- Sodium Chloride.....5gr
- Agar15gr
- Água destilada 100,0 ml

Após a mistura, as substâncias foram fervidas e adicionadas cerca de 20 ml em placas de petri devidamente esterilizadas.

Meio de cultura seletivo – Para verificar o efeito antibiótico da própolis, foram preparados meios de cultura seletivos. Esses meios consistiam na preparação do meio de cultura Tryptic Soy Agar adicionado a esse meio uma pequena concentração da própolis (1%, 2% e 4%). Após a mistura, as substâncias foram fervidas e adicionadas cerca de 20 ml em placas de petri devidamente esterilizadas.



Figura 09- Foto mostrando preparação do meio de cultura (Foto: Carlos Leandro)

3.7- COLETA DO MATERIAL

O material coletado foi uma amostra de saliva de um doador que apresentava alta inflamação de garganta devido à ação de bactérias. Apesar da garganta altamente

inflamada, o doador atendia as exigências relativas às condições satisfatórias de saúde geral e, particularmente, de saúde bucal, ou seja: ausência de lesões de cárie e de periodontopatias; rigoroso controle de placa bacteriana e de possíveis sangramentos gengivais; não estar em uso de aparelho ortodôntico e possuir no mínimo, 24 dentes. (KRASSE, 1998).

O doador voluntário do material nessa pesquisa foi devidamente informado quanto aos objetivos e a metodologia traçados para a realização do presente trabalho, e a coleta do material só foi realizada após firmar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

3.8- ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Para isolamento das bactérias, foi utilizada a metodologia de inoculação bacteriana segundo a técnica de derramamento (*Pour Plate*). Nesta técnica, após a coleta, a saliva foi diluída em soro fisiológico, na proporção de 1/1000, ou seja, 1 ml de material contendo os microorganismos para 1 litro de soro fisiológico, deste modo foi possível obter células individuais que crescem em colônias completamente separadas uma das outras quando colocado no meio de cultura.

As amostras foram inicialmente pré-incubadas a 37°C, por 24 horas e posteriormente, utilizando uma alça de platina, inoculadas em placas contendo o meio de cultura. Após esse período, as colônias com características próprias de *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* foram transferidas, novamente com auxílio de alça de platina, para outros meios de cultura a 37°C, por 24 horas, a fim de conseguir culturas pura para cada grupo de bactérias.

A identificação dos grupos de bactérias se deu pela observação direta de sua morfologia ao microscópio óptico com aumento de 1600 vezes.

3.9- INOCULAÇÃO DOS MICROORGANISMOS NOS MEIOS DE CULTURA

Após a obtenção de culturas puras de *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus*, as bactérias foram introduzidas aos meios de cultura Tryptic Soy Agar para realização do controle e a e Tryptic Soy Agar adicionado com própolis a uma concentração de 1%, 2% e 4% para verificar o efeito antibiótico da própolis nessas concentrações. Foram realizadas cinco amostras de cada meio de cultura, além de duas amostras não inoculadas para verificar a eficiência da esterilização.

Após as inoculações, os grupos controles, os grupos não inoculados e os grupos experimentais foram incubados a 37 °C, durante 48 h, em estufa bacteriológica termo-regulável, nos períodos de 12h, 24h, 48 h para verificar o efeito antibiótico da própolis sobre as bactérias.



Figura 10- Foto mostrando Inoculação dos Microorganismos nos Meios de Cultura. (Foto: Ademar)

3.10- ANÁLISE DOS DADOS

As análises dos dados foram realizadas através da observação e contagem de colônias bacterianas após um período de 12h, 24h e 48h.

As análises demonstraram que a própolis é realmente um excelente antibiótico natural, nos períodos de 12h, 24h e 48h os meios de cultura inoculados para análise do potencial antibiótico da própolis contra bactérias comuns em uma infecção de garganta foram analisados e em nem um desses meios de cultura ocorreu desenvolvimento bacteriano nas concentrações do estudo (1%, 2% e 4%).

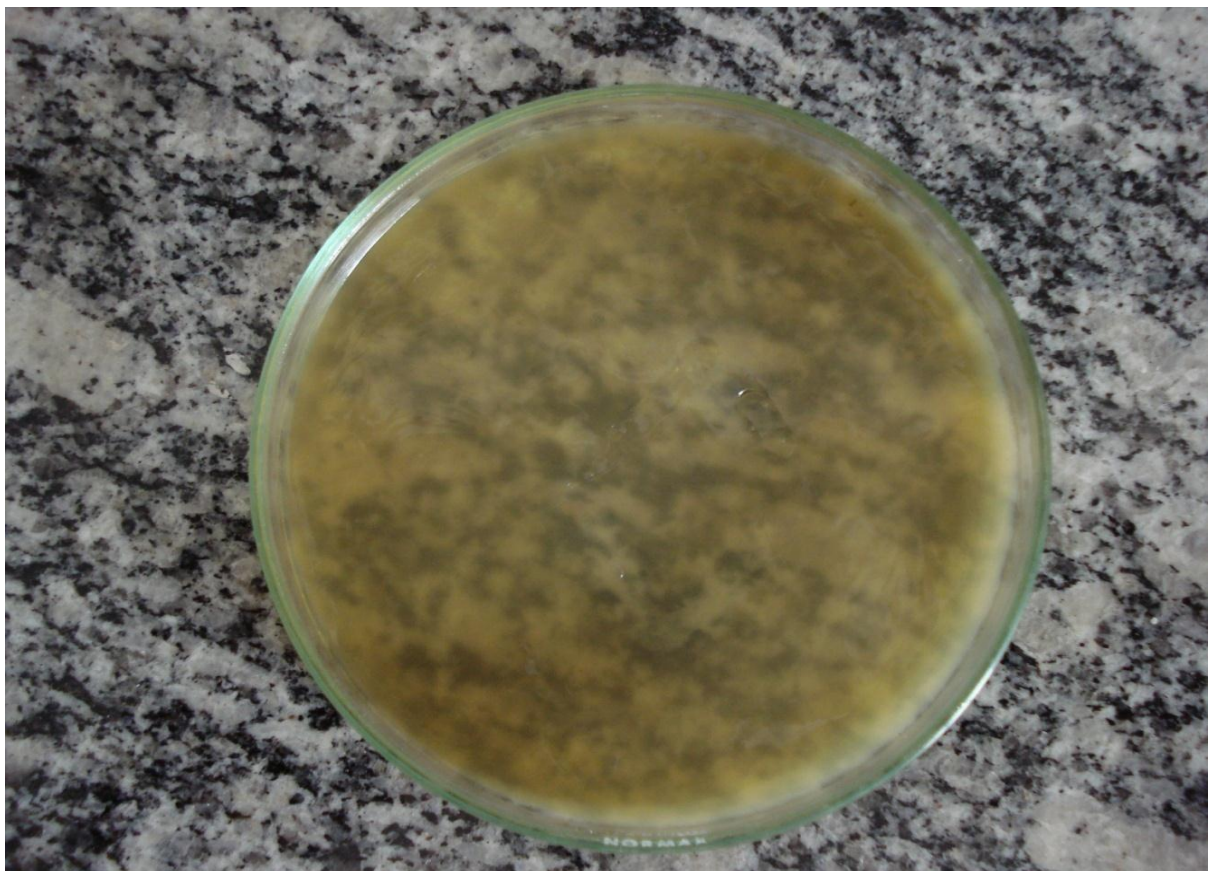


Figura 11- Foto mostrando um meio de cultura inoculado por bactéria após 48 horas. A foto demonstra a ausência de crescimento bacteriano. (Foto: Carlos Leandro)

Conforme esperado, os grupos não inoculados, independente do período, não apresentaram crescimento bacteriano, o que demonstra que a esterilização como um todo foi eficiente.

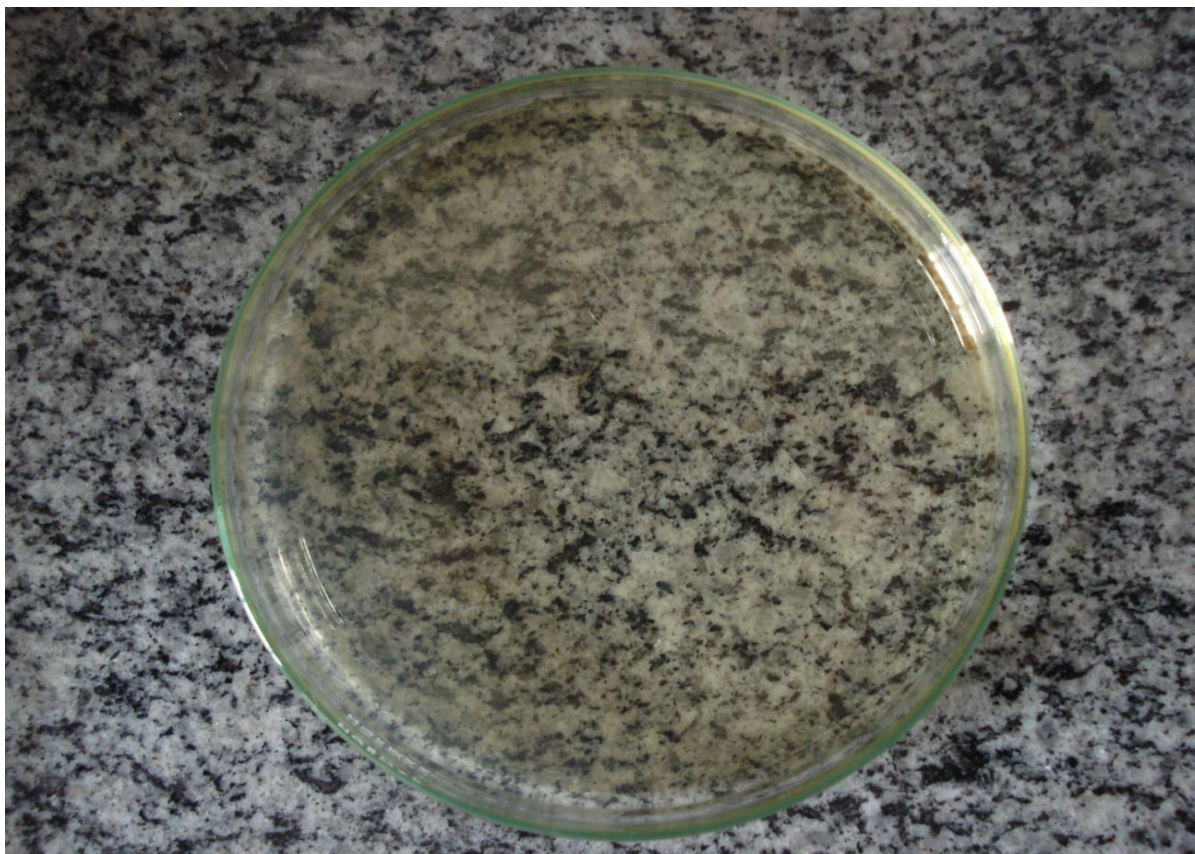


Figura 12- Foto mostrando um meio de cultura não inoculado por bactéria após 48 horas. A foto demonstra a eficiência da esterilização. (Foto: Carlos Leandro)

Os grupos controle de *Bacillus* apresentaram crescimento bacteriano leve para 12h, acentuado para 24h e muito acentuado para 48h, conforme a tabela 01 e o gráfico 01. Já os grupos de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. apresentaram crescimento leve para 12h e muito acentuado para 24h e 48h, conforme as tabelas 02 e 03 e gráficos 02 e 03.

Tabela 01- Número de colônias de *Bacillu* spp. no grupo controle.

<i>Bacillu</i> spp.	Nº colônias 12h.	Nº colônias 24h.	Nº colônias 48h.
Amostra 01	3	8	>16
Amostra 02	1	4	13
Amostra 03	2	5	16
Amostra 04	2	5	>16
Amostra 05	4	8	>16

Tabela 02- Número de colônias de *Staphylococcus* spp. no grupo controle.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Nº colônias 12h.	Nº colônias 24h.	Nº colônias 48h.
Amostra 01	1	10	>16
Amostra 02	2	14	>16
Amostra 03	1	12	>16
Amostra 04	3	12	12
Amostra 05	2	9	>16

Tabela 03- Número de colônias de *Streptococcus* spp. no grupo controle.

<i>Streptococcus</i> spp.	Nº colônias 12h.	Nº colônias 24h.	Nº colônias 48h.
Amostra 01	3	12	>16
Amostra 02	2	14	>16
Amostra 03	3	11	>16
Amostra 04	4	13	>16
Amostra 05	0	9	14

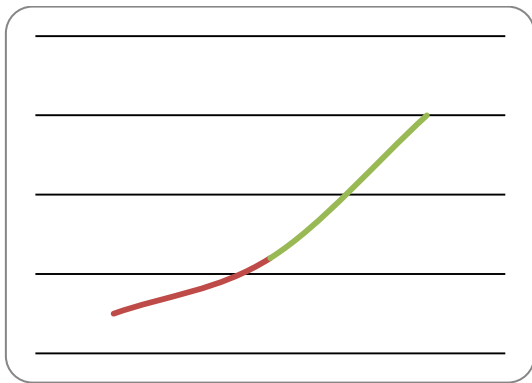


Gráfico 01- Número de colônias de *Bacillus* spp. no grupo controle.

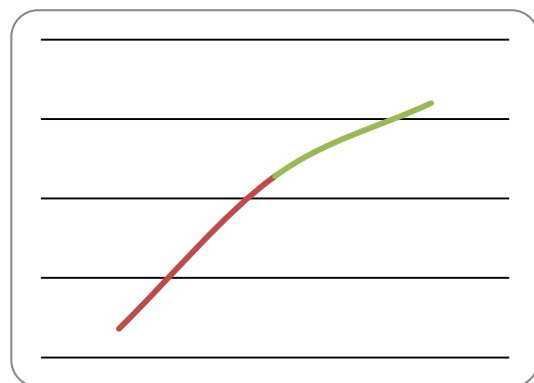


Gráfico 02- Número de colônias de *Staphylococcus* spp. no grupo controle.

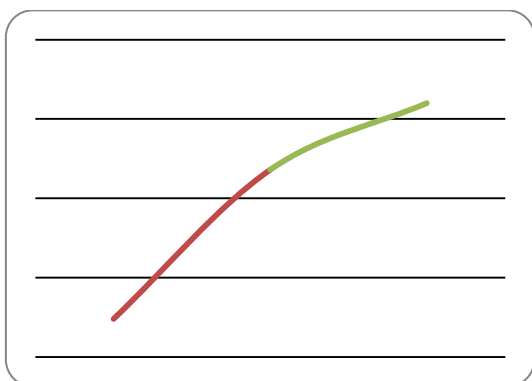


Gráfico 03- Número de colônias de *Streptococcus* spp. no grupo controle.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Atualmente ainda há muito que se estudar sobre a própolis no Brasil e seu efeito antibiótico, assim como também os possíveis efeitos colaterais do uso dessa substância em seres vivos, já que poucas pesquisas a nível acadêmico estão sendo realizadas nesse sentido.

Todas as espécies bacterianas utilizadas nesse trabalho se mostraram sensível à ação inibitória da própolis nas concentrações de 1%, 2% e 4%. Deste modo, fica claro que, mesmo em concentrações pequenas, a ação da própolis é muito inibidora para alguns tipos de bactérias que causam infecção de garganta, e que essa substância é realmente um antibiótico natural inibidora de alguns microorganismos.

Embora outras pesquisas devam ser realizadas, parece que para infecções de garganta, a própolis pode substituir em alguns casos e com bastante critério, o uso de antibióticos sintéticos, uma vez que inibiu o crescimento das cepas bacterianas causadoras dessa doença. Há de se enfatizar também que a própolis possui a vantagem de ser um produto natural, e possui inúmeras substâncias terapêuticas compatíveis com o metabolismo dos mamíferos, o que reduz a possibilidade de causar reações adversas, em comparação aos produtos industrializados testados (SWERTS *et al.*, 2005). No entanto é importante destacar que medicamento nenhum, mesmo os mais simples podem ser utilizados sem conhecimento de um médico e esse trabalho não tem a intenção de incentivar o uso indiscriminado da própolis.

Nos meios de cultura na ausência da própolis, todas as espécies de bactérias mostraram crescimento ótimo, demonstrando que as cepas bacterianas estavam em boas condições e que o experimento foi válido.

Embora os resultados aqui apresentados demonstrassem uma grande ação inibidora da própolis, essa substancia não pode ser considerada como um antibiótico para todas as bactérias. Um grande problema da própolis, assim com de outras substancias naturais, é que sua composição pode variar de acordo com o modo de

preparação e condições sazonais. Desse modo o uso da própolis, quando realizado sem a orientação de um especialista ou mesmo se o produto não for de qualidade, pode não ter o efeito esperado e em alguns casos ser até prejudicial, podendo permitir o aumento das resistências bacterianas a antibióticos sintéticos.

4.2- CONCLUSÃO

- A própolis utilizada neste trabalho mostrou-se muito inibidora *in vitro* de bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* capazes de causar infecção de garganta.
- Mesmo em baixas concentrações, como a utilizadas nesse trabalho (1%, 2% e 4%), alguns tipos de própolis podem possuir um grande efeito antibiótico contra bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* capazes de causar infecção de garganta.
- O fato da própolis utilizada nesse trabalho ter mostrado um grande efeito antibiótico e ser uma substância natural, não significa que seu uso pode ser realizado sem orientação de um profissional adequado.
- Embora esse trabalho tenha demonstrado um excelente resultado, ainda são necessários outros estudos *em vivo* da própolis para confirmação do seu efeito antibiótico sobre bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Bacillus* capazes de causar infecção de garganta e outras bactérias patogênicas, assim como também verificação da menor concentração da substância capaz de exercer um efeito antibiótico eficiente sobre esses microorganismos.

4.3- LIMITAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa apresentou resultados muito satisfatórios, superior aos esperados, porém devido à dificuldade de conseguir uma quantidade suficientemente grande de material biológico e ao pequeno período de pesquisa, não foi possível a realização de meios de cultura inferior a 1% de própolis, demonstrando impossibilidade de

verificar qual a concentração mínima do uso dessa substância para controle de infecção de garganta, assim como também não foi possível observar uma curva de crescimento bacteriano em meios de cultura com a própolis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, T. **Cromatografia no estudo da própolis**. Food Chemistry, v.42, p.135-138, 1991.

BANKOVA VS, POPOV SS, MAREKOV NL 1998. **Composição química da própolis e suas frações antivirais**. Acta Microbiol Bulg 23: 52-57.

BANKOVA VS, Castro SL, Marcucci MC 2000. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin**. Apidologie 31: 3-15.

BANKOVA VS 2005. **Recent trends and important developments in propolis research**. Evid Based Complement Alternat Med 2: 29-32.

BARROS MP, SOUSA JPB, BASTOS JK, ANDRADE SF 2006. **Efeitos da própolis verde em úlceras e gástrite de ratos no brasil**. J Ethnopharmacol, DOI:10.1016/j.jep.

BAZO AP, RODRIGUES MAM, SFORCIN JM, VIANA DE CAMARGO JL, RIBEIRO LR, SALVADORI DMF 2002. **Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis**. Teratogen Carcinogen Mutagen 22: 183-194.

BURDOCK GA 1998. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis**. Food Chem Toxicol 36: 347- 363.

BURTON, G.; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia para Ciências da Saúde**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 426 p.

CHEZERIES, Jean-François. **A Saúde pelo mel e produtos da colméia**, Litexa, Portugal, 1984. 103 p.

FERREIRA RC, Valente PHM, Barbosa AD 1996. **Atividade antibacteriana da própolis**. Lecta-USF 14: 65-93

FUENTES, A.M.; HERNANDEZ, N. **Ação antimicrobiana nos extratos alcoólicos de própolis**. Revista Cubana de Farmacia, v.24, p.34-44, 1990.

GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. **Propriedades antibacteriana da própolis**. Journal of the Royal Society of Medicine, v.83, p.159-160, 1990.

HAVSTEEN B 1983. H.Flavonoids, **A class of natural products of high pharmacological potency**. Biol Pharm 32: 1141-1148.

KRASSE B.1998. **Risco de cárie: um guia prático para avaliação e controle**. Quintessence. 10: 113.

MARCUCCI MC 1995. **Propolis-chemical-composition, biological properties and therapeutics activity.** *Apidologie*. 26: 83-99.

MARCUCCI MC 1996. **Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis.** *Quim Nova*. 19: 529-535.

MARCUCCI MC, FERRERES F, GARCIA-VIGUERA C, BANKOVA V, DE CASTRO SL, DANTAS AP, VALENTE PH, PAULINO N 2001. **Phenolics compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.** *J Ethnopharmacol* 74: 105-112.

MENEZES H 2005. **Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas.** *Arq. Inst. Biol.* 72: 405-441.

MERESTA, L.; MERESTA, T. **Sensitivity of bovine mastitis bacteria to propolis in vitro.** *Medycyna-weterynaryjna*, v.41, p.489-492, 1985.

MISSIMA F, DA SILVA FILHO AA, NUNES GA, BUENO PCP, SOUSA JPB, BASTOS JK, SFORCIN JM 2006. **Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation.** *J. Pharm Pharmacol* Manuscrito N° JPP-D-06-00167R1 (In Press).

MURAD J.M, CALVI SA, SOARES AMVC, BANKOVA VS, SFORCIN JM 2002. **Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*.** *J Ethnopharmacol* 79: 331-334.

PELCZAR JR, MICHAEL J.; CHAN, E. C. S; KRIEG, NOEL R. **Microbiologia Conceitos e Aplicações.** Volume 1. 2ª ed. São Paulo: Pearson, 2005. 524 p.

PELCZAR JR, MICHAEL J.; CHAN, E.C.S; KRIEG, NOEL R. **Microbiologia Conceitos e Aplicações.** Volume 2. 2ª ed. São Paulo: Pearson, 2005. 517 p.

PARK Y.K, IKEGAKI M, ALENCAR SM, MOURA FF 2000. **Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity.** *Honeybee Science* 21: 85-90.

PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, AQUINO NETO FR 2002. **Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras.** *Quim Nova* 25: 321-326.

PRADO FILHO, L.G.; AZEVEDO, J.L.; FLECHTMANN, C.H. **Antimicrobianos em própolis de *Apis mellifera* L.** *Boletim da Indústria Animal*, v.20, p.399-403, 1962.

REIS C.M.F, CARVALHO JCT, CAPUTO LRG, PATRÍCIO KCM, BARBOSA MVJ, CHIEFF AL, BASTOS JK 2000. **Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis.** *Rev Bras Farmacogn* 10: 43-52.

SALTINO A 2005. **Origin and chemical variation of brasilian propolis.** *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 33-38.

SIMÕES LMC, GREGORIO LE, DA SILVA FILHO AA, DE SOUZA ML, AZZOLINI AECS, BASTOS JK, LUCISANO-VALIM YM 2004. **Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils.** *J Ethnopharmacol* 94: 59-65.

SFORCIN JM, FERNANDES Jr A, LOPES CAM, BANKOVA V, FUNARI SRC 2000. **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** *J Ethnopharmacol* 73: 243-249.

SFORCIN JM, ORSI RO, BANKOVA V 2005. **Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production.** *J Ethnopharmacol* 98: 301-305.

SOARES AKA, CARMO GC, QUENTAL DP, NASCIMENTO DF, BEZERRA FAF, MORAES MO, MORAES MEA 2006. **Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluífera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis.** *Rev Bras Farmacogn* 16: 447-454.

SHUB, T.A.; KAGRAMANOVA, K.A.; KIVMAN, G.Y.; TIKHONOV, A.I.; GRITSENKO, V.I. **Antimicrobial activity of propolis extracts.** *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v.11, p.1242-1244, 1978.

SWERTS MSO, Freitas E, Silva DS, Maldonado DV, Totti da Costa JM, Medeiros UV 2002. **Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais.** *JBE* 3: 256-261.

TAVARES JP, MARTINS IL, VIEIRA AS, LIMA FAV, BEZERRA FAF, MORAES MO, MORAES MEA 2006. **Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis.** *Rev Bras Farmacogn* 16: 350-356.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

VALDES, G.; RUIZ, M.; MARTIN, M. **Caracterizacion antibacteriana del propoleo de los municipios de Madruga y Mariel de la provincia de La Habana.** Ciencia y Tecnica Agricultura-Apicultura. Havana, v.5, p.25-37, 1989.