

Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis marrom da região sul do Brasil*

Tony Picoli¹⁺, Cristina Mendes Peter², Jessica Fernanda Hoffmann³, Giulia Soares Latosinski⁴, João Luiz Zani⁵, Gilberto D'Ávila Vargas⁶, Silvia de Oliveira Hübner⁶ e Geferson Fischer⁶

ABSTRACT. Picoli T., Peter C.M., Hoffmann J.F., Latosinski G.S., Zani J.L., D'Ávila Vargas G., Hüber S. de O. & Fischer G. [**Chemical characterization and antibacterial action of brown propolis extract from Southern Brazil.**] Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis marrom da região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(4):365-371, 2016. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, *Campus* Universitário Capão do Leão s/n, Capão do Leão, RS 96900-010, Brasil. E-mail: picolivet@gmail.com

The aim of this study was to characterize chemically a sample of brown propolis and determine the time of action needed for eliminating microorganisms causing bovine mastitis. It was prepared hydroalcoholic extract of brown propolis (25 mg/mL) and this was evaluated for content of total phenolic compounds, total flavonoids, qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds by liquid chromatography coupled to mass spectrometry and antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. It was found 34.39% and 13.46% of flavonoids and phenolic compounds, respectively, among which stand out ferulic acid (0.09 mg/g), caffeic acid (0.17 mg/g) and p-coumaric acid (3.39 mg/g). In the first 15 minutes incubation, all counts differed from the initial counts ($p < 0.01$). With 15 minutes of exposure to the extract, *Escherichia coli* was inhibited by 38.72% and differed from the other bacterial genus ($p < 0.01$, $n = 6$). *Staphylococcus* spp. has had inhibition of 46.03% and *Streptococcus* spp. of 50.8%. After 2 hours incubation, the genus *Streptococcus* was totally eliminated, *Staphylococcus* spp. after 3 hours and *E. coli* after 4 hours. Clearly, *E. coli* was more resistant bacteria than *S. aureus*. The other species of *Staphylococcus* and *Streptococcus* did not show large differences between the counts. We concluded that the composition of the brown propolis sample from Southern Brazil showed large levels of phenolic acids with proven antibacterial action, what explains the bactericidal activity found.

KEY WORDS. Antimicrobial, natural products, action time.

*Recebido em 23 de dezembro de 2015.

Aceito para publicação em 8 de abril de 2016.

¹ Médico-veterinário, MSc. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), *Campus* Universitário Capão do Leão s/n, Capão do Leão, RS 96900-010. * Autor para correspondência, E-mail: picolivet@gmail.com - bolsista CAPES.

² Médica-veterinária, MSc. Residente em Saúde Coletiva, Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional, UFPel, *Campus* Universitário Capão do Leão s/n, Capão do Leão, RS 96900-010. E-mail: cristina_peter@hotmail.com

³ Tecnóloga em Alimentos, Msc. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFPel, *Campus* Universitário Capão do Leão s/n, Capão do Leão, RS 96900-010. E-mail: jessicafh91@hotmail.com - bolsista CAPES.

⁴ Médica-veterinária, Residente em Zoonoses e Saúde Pública, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, *Campus* Unesp/Botucatu, Distrito Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP 18618-970. E-mail: giulia.latosinski@gmail.com

⁵ Médico-veterinário, DSc. Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel, *Campus* Universitário Capão do Leão s/n, Capão do Leão, RS 96900-010. E-mail: jluizzani@outlook.com

⁶ Médico-veterinário, DSc. Laboratório de Virologia e Imunologia, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel, *Campus* Universitário Capão do Leão s/n, Capão do Leão, RS 96900-010. E-mails: gdavilavargas@gmail.com; silviaohubner@gmail.com; geferson.fischer@gmail.com

RESUMO. O objetivo desse estudo foi caracterizar quimicamente uma amostra de própolis marrom e determinar o tempo de ação necessário para eliminar micro-organismos causadores de mastite bovina. Foi preparado extrato hidroalcoólico de própolis marrom (25 mg/mL) e esse foi avaliado quanto ao teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, análise qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp. Foram encontrados 34,39% e 13,46% de compostos fenólicos e flavonóides, respectivamente, dentre os quais se destacam ácido ferúlico (0,09 mg/g), ácido cafeico (0,17 mg/g) e ácido p-cumárico (3,39 mg/g). Nos primeiros 15 minutos de incubação todas as contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) diferiram das contagens iniciais ($p < 0,01$). Em 15 minutos de exposição ao extrato, *Escherichia coli* foi inibida em 38,72% e diferiu dos demais gêneros ($p < 0,01$, $n=6$), sendo que *Staphylococcus* spp teve inibição de 46,03% e *Streptococcus* spp de 50,8%. Após 2 horas de incubação, o gênero *Streptococcus* foi totalmente eliminado, *Staphylococcus* spp após 3 horas e *E. coli* após 4 horas. Notadamente, *E. coli* foi a bactéria mais resistente, seguida de *S. aureus*. As demais espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* não apresentaram diferenças entre as suas contagens. Conclui-se que a composição da amostra de própolis marrom do sul do Brasil apresenta grandes teores de ácidos fenólicos com ação antibacteriana comprovada, o que explica a atividade bactericida encontrada.

PALAVRAS-CHAVE. Antimicrobiano, produto natural, tempo de ação.

INTRODUÇÃO

A busca por antimicrobianos de origem natural têm estimulado as pesquisas visando determinar substitutos aos fármacos sintéticos tradicionalmente utilizados e que vêm apresentando menor eficácia devido à resistência adquirida por micro-organismos, em decorrência do uso prolongado e indiscriminado (Bastos et al. 2011). A sociedade, tornando-se mais consciente dos benefícios dos produtos naturais para a saúde, tem estimulado a descoberta de alternativas aos tratamentos e/ou prevenção de enfermidades infecciosas, baseados em produtos derivados de plantas.

Dentre a ampla variedade de produtos naturais, a própolis vêm ganhando destaque nas últimas décadas. Coletada pelas abelhas de diversas partes das plantas, sua aparência e composição variam de

acordo com sua procedência, espécie vegetal, sazonalidade e espécie de abelha, podendo apresentar-se de cor marrom escuro, esverdeada ou marrom avermelhada (Marcucci 1996). Mais de 300 constituintes químicos já foram descritos, que lhe conferem propriedades biológicas e farmacológicas como atividade antiviral, antifúngica, antiprotozoária, antibacteriana, anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante, imunomoduladora, dentre outras (Marcucci 1996, Bankova et al. 2000, Kumazawa et al. 2004, Bankova 2005, Fischer et al. 2007).

Na produção leiteira, a mastite bovina é a enfermidade infecciosa com maior incidência entre os rebanhos, causando enormes prejuízos econômicos. Trata-se de uma inflamação da glândula mamária, causada geralmente por micro-organismos de origem bacteriana (Watts 1988, Bressan 2000). Resulta em alterações no leite como aumento na presença de micro-organismos e da contagem de células somáticas (CCS), que é um importante indicador da condição sanitária do rebanho. Picoli et al. (2015), observaram que 28,1% dos animais dos rebanhos leiteiros da região sul do RGS tiveram CCS acima do parâmetro legal, o que indicou altos índices de mastite. Barbalho & Mota (2001) relataram que a mastite subclínica se alastra silenciosamente pelo rebanho sem que os produtores encontrem sinais clínicos no úbere ou de sua secreção. Os micro-organismos associados a essas infecções variam com a região e o manejo dos animais, porém os mais envolvidos encontram-se nos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Escherichia* (Radostits et al. 2002).

A transmissão pode ser impedida através da higienização de fômites e dos tetos antes das ordenhas, o chamado *pré-dipping*, que é realizada ao imergir a superfície do teto em soluções bactericidas (Radostits et al. 2002). A utilização da própolis nessa etapa amplia as alternativas do produtor de diminuir a resistência bacteriana frente aos produtos utilizados corriqueiramente.

O objetivo desse estudo foi caracterizar quimicamente e determinar o tempo necessário para eliminar os principais agentes causadores de mastite bovina quando expostos a soluções hidroalcoólicas de própolis marrom.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do extrato de própolis marrom

As amostras de própolis marrom foram adquiridas da Cooperativa de Apicultores e Fruticultores da Região Sul, localizada no Município de Pelotas, RS. Os extratos hidroalcoólicos foram preparados conforme Paulino et al. (2002). As amostras de própolis foram congeladas a

-70°C para posterior trituração. A extração foi realizada em solução contendo álcool 96° GL na proporção de uma parte de própolis para 3 partes de álcool, sob agitação por 24 horas, a 37°C. Após, o solvente ser evaporado, a matéria seca resultante foi dissolvida em tampão fosfato (pH 7,2) e emulsificada ao utilizar EUMULGIN® HRE-40 para obtenção da concentração final de 100 mg/ml. A esterilização do composto foi realizada em filtro hidrofílico com porosidade de 22µm. A seguir, foi realizada a diluição com água destilada estéril até a concentração de uso.

Determinação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico baseado na reação com o reagente Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi 1965). Inicialmente foi realizada uma diluição do extrato hidroalcoólico de própolis marrom (40 µl do extrato de própolis em 3960 µl de metanol absoluto). Posteriormente, em tubos *falcon* de 15 ml, pipetou-se 250 µl do extrato, 4 ml de água destilada, 250 µl da solução Folin-Ciocalteu 0,25N, homogeneizou-se e deixou-se reagir por 3 minutos. A seguir, foram adicionados 500 µl de carbonato de sódio 1N. A mistura foi homogeneizada e incubada por 2 horas. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda 725 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por g⁻¹ de amostra

Determinação de flavonóides totais

Para análise de flavonóides totais dos extratos da própolis utilizou-se metodologia descrita por Zhishen et al. (1999). Em tubos *falcon* de 15 mL acrescentou-se 2 mL de água destilada, 500 µL do extrato metanólico e 150 µL de NaNO₂ 10%. Após cinco minutos, adicionou-se 150 µL de AlCl₃ 20%, com posterior incubação por seis minutos. Após, foram adicionados 1 mL de NaOH 1 mol/L e 1,2 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda 510 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina por g⁻¹ de amostra.

Perfil qualitativo e quantitativo de compostos fenólicos e flavonoides por cromatografia líquida acoplada a Espectrometria de Massas (UFLC-PDA-ESI-TOF/MS)

A composição química dos extratos de própolis foi determinada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Para isso, dez microlitros dos extratos foram injetados em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Prominence) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (tipo quadropolo-tempo de voo) (MicrOTOF-Q, Bruker Daltonics). Os compostos fenólicos foram separados utilizando pré-coluna C18 (2,0 x 4 mm) e coluna Luna C18 (2,0 x 150 mm, 100 Å, 3 µm) Phenomenex (Torrance, CA, EUA), sendo solução de ácido fórmico em água (0,1% v/v, eluente A) e metanol (eluente B) usadas como fase móvel, com fluxo de 0,2 mL min⁻¹ e temperatura da coluna a 40°C. O gradiente de eluição foi: 0-2 min, 10% B; 2-15 min, 10-75% B; 15-30 min, 75% B; 30-32 min 75-10% B; 32-40 min, 10% B. O detector PDA foi definido

para digitalizar no intervalo 210-800 nm. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI negativo, com voltagem do capilar em 4000 V, pressão do gás de nebulização (N₂) de 2 bar, gás de secagem em 8L/min e temperatura da fonte de 180°C, usando os parâmetros padrões do equipamento. O equipamento foi calibrado com formiato de sódio 10mM, cobrindo toda a faixa de aquisição (de m/z 50 até 1200). Os espectros de massa foram processados utilizando o software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics).

Para quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides dos extratos de própolis foram preparadas curvas de calibração utilizando os padrões externos: ácido gálico, catequina, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogênico, epitequina, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido siringico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rutina, ácido elágico, miricetina, quercetina, hesperetina, kaempferol, luteolina, apigenina, pinocembrina, crisina e galangina, nas concentrações variando de 0 a 10 µg/ml. Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram caracterizados pela sua UV/Vis (220-800 nm), os tempos de retenção em relação aos padrões externos e os espectros de massa.

Avaliação antibacteriana da própolis

As bactérias utilizadas no estudo foram isoladas e caracterizadas de amostras de leite provenientes de quartos com mastite bovina segundo Quinn et al. (2011). Seis cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* foram descongeladas e semeadas em placas de Petri contendo Agar-sangue ovino 5% e, após 24 horas de incubação em aerobiose em estufa bacteriológica sob temperatura de 37°C, foram suspensas em solução salina estéril a 0,85% até turbidez ajustada sob a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ bactérias/ml) e diluída 3 vezes na base 10.

Essas suspensões bacterianas foram incubadas, em dois tubos idênticos contendo solução de própolis 25 mg/ml, em estufa bacteriológica a 37°C. Em 8 momentos distintos (zero, 15 e 30 minutos, uma, duas, três, quatro, cinco e seis horas) foram coletados 100 µl de cada tubo e semeados em triplicata em placas contendo Agar PCA (Plate Count Agar) utilizando a técnica *pour-plate*. Após 24 horas de incubação, as placas foram submetidas às contagens de unidades formadoras de colônias (UFC).

Análise estatística

Os valores obtidos nas contagens de unidades formadoras de colônias foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias foi realizada através do teste de Tukey utilizando o software estatístico BioEstat® versão 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato hidroalcoólico da própolis marrom podem ser observados na Tabela 1.

No extrato utilizado no presente trabalho, existe uma quantidade de fenóis e flavonóides acima do requisito mínimo determinado pela legislação (Tabela 1). O valor encontrado de flavonóides totais ($13,46 \pm 0,74\%$), expressos como equivalentes de catequinas, está acima do encontrado por Bonvehí & Coll (1994) e Funari & Ferro (2006), os quais obtiveram 2,64% e 3% respectivamente, de flavonóides

Tabela 1. Teor de fenóis e flavonóides totais do extrato hidroalcoólico da própolis marrom utilizado como ação antibacteriana.

Análise	Média \pm Desvio Padrão (%)	Requisito do Ministério ^a
Fenóis Totais ^b	34,39 \pm 1,91	Mínimo de 5%
Flavonóides Totais ^c	13,46 \pm 0,74	Mínimo de 0,5%

^aRequisito do Ministério da Agricultura ^bExpressos como equivalentes de ácido gálico, sobre a própolis bruta (M/M). ^c Expressos como equivalentes de catequina, sobre a própolis bruta (M/M).

Tabela 2. Análise qualitativa e quantitativa do extrato hidroalcoólico de própolis marrom por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo (ESI negativo).

Compostos	Análise	
	qualitativa	quantitativa (mg/g)
Ácido gálico	-	
Catequina	-	
4-ácido Hydroxybenzoico	+	
Ácido clorogênico	+	0,36
Epitequina	-	
Ácido cafeico	+	0,17
Ácido vanílico	+	
Ácido siringico	+	
Ácido p-cumárico	+	3,39
Ácido ferúlico	+	0,09
Rutina	+	0,65
Ácido elágico	+	
Myricetina	-	
Quercetina	+	
Hesperetina	+	
Kaempferol	+	
Luteolina	+	
Apigenina	+	
Pinocebrina	+	
Crisina	+	
Galangina	+	

Detectado (+); não detectado (-).

totais em amostras de própolis brasileiras coletadas de *Citrus sinensis* L., *Coffea arabica* L., *Saccharum officinarum* L. and *Eucalyptus* spp.

O teor de fenóis totais encontrado na amostra investigada, de $34,39\% \pm 1,91\%$ (Tabela 1), atende ao requisito mínimo do Ministério da Agricultura, que é de 5% (Brasil 2001). Woisky & Salatino (1998) encontraram valores inferiores (7,05 e 9,29%) em amostras de própolis coletadas em diferentes municípios do estado de São Paulo, aplicando o mesmo método espectrofotométrico, utilizando a quercetina como substância de referência. Paralelamente, utilizaram o método de reação de substâncias fenólicas com o reagente de Folin-Ciocalteu, onde tinham o ácido gálico como substância de referência, o mesmo utilizado no presente estudo, chegaram a valores entre 9,49 e 13,72% para as mesmas amostras.

González et al. (2003) determinaram as concentrações de substâncias fenólicas por três métodos calorimétricos diferentes, tendo encontrado valores entre 3,25% e 33,49% para as análises em que utilizou o reagente de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como substância de referência, mesma metodologia utilizada no presente estudo, que também obteve valores semelhantes (34,39%) de fenóis totais.

A análise qualitativa e quantitativa do extrato de própolis marrom está apresentada na tabela 2. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em modo negativo (ESI negativo) identificou e quantificou a presença de ácidos fenólicos como ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido p-cumárico, reconhecidamente substâncias com ação antimicrobiana (Marcucci et al. 1996).

Sabe-se que a composição da própolis de abelhas *Apis mellifera* varia conforme sua região de origem (Bastos et al. 2011). Amostras de própolis brasileiras possuem propriedades biológicas e composição química distintas de acordo com a região de coleta (Bastos et al. 2011). Pereira et al. (2002), descrevem que essa variação é facilmente explicada pela vasta biodiversidade brasileira, bem como, até certo

Tabela 3. Porcentagem de inibição bacteriana em função do tempo de exposição ao extrato de própolis marrom 25 mg/ml.

Micro-organismos	Tempo de exposição						
	0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	30,9 \pm 7,6 ^a	56,0 \pm 3,9 ^b	82,9 \pm 3,1 ^b	95,7 \pm 1,9 ^a	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	56,0 \pm 5,9 ^c	76,0 \pm 2,9 ^{c,d}	94,4 \pm 1,6 ^c	0 ^b	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0	49,9 \pm 6,7 ^c	72,6 \pm 3,1 ^c	95,7 \pm 1,3 ^c	0 ^b	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	55,9 \pm 5,7 ^c	81,4 \pm 5,2 ^d	99,5 \pm 3,7 ^d	0 ^b	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	48,4 \pm 7,2 ^c	77,8 \pm 4,3 ^{c,d}	97,1 \pm 2,3 ^c	0 ^b	0	0
<i>Streptococcus uberis</i>	0	48,2 \pm 4,9 ^c	73,9 \pm 4,9 ^c	96,9 \pm 1,9 ^c	0 ^b	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	38,7 \pm 7,5 ^b	50,3 \pm 3,4 ^a	71,0 \pm 4,9 ^a	91,9 \pm 2,8 ^a	97 \pm 1,9	0

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

ponto, a capacidade bioquímica das abelhas em modificar a composição nativa ou adicionar seus componentes próprios a própolis.

A amostra de própolis marrom no presente estudo é oriunda da região sul do Brasil. Autores descrevem que a própolis marrom do sul do Brasil contém flavonoides como a crisina e a pinocembrina (Bastos 2011). Esses flavonoides foram identificados no presente estudo, porém não quantificados (Paulino et al. 2002, Bastos et al. 2011).

Os compostos identificados no extrato de própolis marrom foram semelhantes aos reportados por Cottica et al. (2015) em amostra de própolis canadense de abelhas *A. mellifera*, onde foram identificados o ácido cafeico, pinobanksina e ácido cafeico éster feniletílico, sendo estes, ácidos fenólicos descritos por Marcucci (1996) como importantes substâncias na atividade antimicrobiana das amostras de própolis brasileira. Em seus estudos, Marcucci & Bankova (1999), apontaram que a própolis brasileira, principalmente das regiões sul e sudeste, é constituída por derivados do ácido p-cumárico, compostos que possuem marcante atividade biológica, como a ação antimicrobiana e antitumoral. A amostra utilizada no presente estudo é oriunda da região sul do RS e apresentou 3,39 mg/g de ácido p-cumárico.

A ação antibacteriana da amostra de própolis marrom do presente estudo fica evidente ao analisar a Figura 1, onde se observa que em apenas 15 minutos de incubação, o extrato hidroalcoólico reduziu $46,03 \pm 8,5\%$ das bactérias do gênero *Staphylococcus*, $50,8 \pm 5,8\%$ do gênero *Streptococcus* e $38,72 \pm 7,5\%$ de *E. coli*. Todas as contagens bacterianas nos primeiros 15 minutos de incubação diferiram estatisticamente das iniciais ($p < 0,01$, $n = 6$). A inibição dos três gêneros avaliados é maior em função do

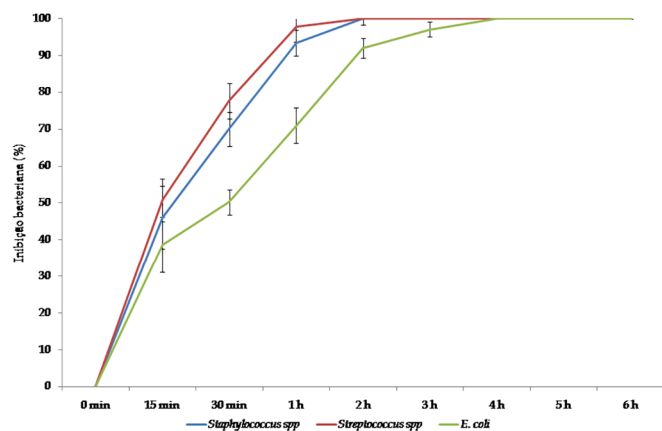


Figura 1. Inibição de três gêneros bacterianos em função do tempo de exposição ao extrato hidroalcoólico de própolis marrom a 25 mg/ml.

tempo de exposição ao tratamento. Após 2 horas de incubação, o gênero *Streptococcus* foi totalmente eliminado, *Staphylococcus spp.* apresentaram $99,97 \pm 1,7\%$ de inibição e *E. coli* a de $91,99 \pm 2,8\%$, sendo inibida completamente após 4 horas de exposição à própolis marrom.

Não houve diferença entre as contagens dos diferentes gêneros bacterianos nos dois primeiros tempos avaliados (zero e 15 minutos), porém a partir dos 30 minutos de incubação, *E. coli* destacou-se por sua maior resistência frente ao tratamento, diferindo estatisticamente dos demais gêneros ($p < 0,01$, $n = 6$), ao passo que *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* não diferiram em nenhum dos períodos avaliados ($p > 0,05$, $n = 6$). Após 30 minutos de incubação, *E. coli* apresentou apenas $50,28 \pm 3,4\%$ de inibição, enquanto que os demais gêneros ultrapassaram os 70%. Após uma hora de incubação, a bactéria Gram negativa apresentou $70,98 \pm 4,8\%$ de inibição, enquanto que os demais gêneros ultrapassaram os 93%.

Segundo Bankova et al. (2005), a própolis brasileira deve suas ações antimicrobianas à presença de ácidos p-cumáricos, prenilados e diterpenos. Estes dados justificam a ação significativa do extrato do presente trabalho frente aos agentes bacterianos testados. A própolis apresentou compostos majoritários como os ácidos cafeico, ferúlico, clorogênico, rutina e em especial o ácido p-cumárico.

Quanto à ação antibacteriana da própolis sugere-se que o extrato etanólico tem efeito bactericida devido à presença de compostos ativos, porém lábeis. Este efeito bactericida é dependente da espécie bacteriana em questão, e apresenta maior eficiência contra bactérias Gram positivas e para algumas espécies de Gram negativas (Ortega et al. 2011). Também, Vargas et al. (2004) descrevem que a resistência das Gram negativas aos compostos naturais já vinha sendo comprovada por diversas pesquisas (Langoni et al. 1996, Marcucci et al. 2001) e a maior resistência à própolis está vinculada à parede celular que, apesar de não ser tão espessa ou rígida, apresenta maior complexidade química e alto teor lipídico, sugerindo uma maior sensibilidade de Gram positivas devido à ação da própolis sobre compostos da parede celular (Bankova et al. 1999, Marcucci et al. 2001).

Os agentes infecciosos causadores de infecções intramamárias em vacas lactantes podem ser classificados de acordo com a maneira de sua transmissão. Esses são considerados ambientais, quando são transmitidos pelo ambiente contaminado, frequentemente associado a fatores de higiene precária nos estábulos, ou infecciosos, quando são transmitidos

de um teto infectado para outro sadio, geralmente no momento da ordenha através de teteiras contaminadas, fômites ou pelas mãos do ordenhados (Radostits et al. 2002).

Quanto ao poder bactericida de própolis marrom sobre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, a Tabela 3 demonstra que as contagens de *S. epidermidis* e *S. intermedius* diminuíram consideravelmente em apenas 15 minutos de exposição à solução de própolis marrom 25 mg/ml, atingindo inibição de 56,01±5,93% e 49,87±6,66%. Estas bactérias foram totalmente inibidas com 2 horas de exposição, porém suas contagens não diferiram entre si durante o experimento ($p>0,05$, $n=6$). Nota-se, entretanto, a maior resistência de *S. aureus* dentro de seu gênero já que, quando comparadas suas contagens às demais, houve diferença ($p<0,05$, $n=6$) até às 2 horas de exposição, período que as demais espécies foram eliminadas. Com 15 minutos de exposição, *S. aureus* foi inibido em apenas 30,88±7,56%, mas foi totalmente inibido com 3 horas de exposição. Esta espécie é a mais importante do gênero *Staphylococcus*, apresentando o maior número de fatores de patogenicidade e resistência (Silva et al. 2007). No presente estudo, *S. epidermidis* apresentou a maior sensibilidade entre as três espécies avaliadas.

Já no que diz respeito ao gênero *Streptococcus*, *S. agalactiae* demonstrou maior sensibilidade que as demais espécies desse gênero aos 30 minutos e uma hora de exposição ($p<0,05$, $n=6$) sendo a espécie mais sensível dentre todas avaliadas. *Streptococcus dysgalactiae* e *S. uberis* não tiveram diferenças em suas contagens ($p>0,05$, $n=6$). É um resultado animador, uma vez que *S. agalactiae* é um organismo altamente contagioso, capaz de causar fibrose e abscessos na glândula mamária, além de elevar muito a CCS. Sua presença preocupa também pelo aspecto da saúde pública, pois é causa importante de meningites e septicemia neonatal (Trabulsi & Alterthum 2005). Por ser um patógeno contagioso, a principal forma de controle é através do manejo e higiene no momento de ordenha e, dessa forma, extrato hidroalcoólico de própolis marrom poderia ser usado como forma de controle da mastite causada por *S. agalactiae*. Já, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* estão vinculados à mastite ambiental, embora possam ter comportamento contagioso uma vez que se encontram infectando um quarto mamário (Brito et al. 1998, Barcelos et al. 2010).

Picoli et al. (2014) encontraram, em leite de tanques resfriadores, média de $5,92 \times 10^4$ unidades formadoras de colônia (UFC)/ mL de leite de *Staphylococcus* spp. e $4,86 \times 10^3$ UFC/mL de *S. aureus*,

concentrações inferiores às utilizadas neste estudo ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL), demonstrando que, se utilizado, o extrato utilizado poderia ter boa eficácia na rotina da atividade leiteira. Esses autores ainda encontraram maiores contagens de *Staphylococcus* spp. ($p<0,05$, $n=274$) em propriedades que não realizam desinfecção dos tetos antes da ordenha. Dessa forma, ressalta-se a importância dessa desinfecção e o extrato hidroalcoólico de própolis marrom mostrou-se efetivo frente a esse e outros gêneros bacterianos.

Costa et al. (2009) não encontraram diferenças entre o uso de própolis a 1% e o uso de soluções cloradas na desinfecção de hortalças e Vilela et al. (2012), afirmam que níveis de contaminação da casca dos ovos por mesófilos totais e fungos (*Aspergillus* e outros bolores), após a desinfecção com própolis, foram menores quando comparados ao controle.

CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico da amostra de própolis marrom do sul do Brasil apresenta em sua composição, importantes ácidos fenólicos e flavonóides com comprovada ação antimicrobiana. O tempo de ação necessária para total eliminação das bactérias foi de 2 horas para o gênero *Streptococcus*, 3 horas para *Staphylococcus* spp e 4 horas para *E. coli*. Assim, o extrato hidroalcoólico de própolis marrom apresenta potencial para ser utilizado na atividade leiteira como forma de prevenção de mastite bovina.

REFERÊNCIAS

- Bankova V., Christov R., Popov S., Marcucci M.C., Tsvetkova I. & Kujumgiev A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70:190-193, 1999.
- Bankova V., De Castro S.L. & Marcucci M.C. Standardization of propolis: present status and perspectives. *Apidologie*, 31:3-15, 2000.
- Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:114-117, 2005.
- Barbalho T.C.F. & Mota R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 2:31-36, 2001.
- Barcelos A.M., Teixeira M.A., Alves L.S., Vieira M.A., Bedim M.L. & Ribeiro N.A. Endocardite infecciosa por *Streptococcus bovis* em paciente com carcinoma colônico. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 95:88-90, 2010.
- Bastos E.M.A.F., Galbiati C., Loureiro M. & Scoaris D.O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, 63:255-259, 2011.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 - Anexo VI - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 Jan 2001.
- Bonvehí J.S. & Coll F.V. Phenolic composition of propolis from China and South America. *Zeitschrift für Naturforschung*, 49:712-718, 1994.
- Bressan M. *Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite*. Juiz de Fora, Embrapa/CNPGL, 2000. 65p.

- Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Souza H.M. & Vargas O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 18:39-44, 1998.
- Costa J.A.M., Mittaraquisi A.S.P., Furtado M.C., Carvalho L.M. & Carnellosi M.A.G. Efeito da sanitização na qualidade microbiológica do manjericão. *Horticultura Brasileira*, 27:3 411-3418, 2009.
- Cottica S.M., Sabik H., Antoine C., Fortin J., Graveline N., Visentainer J.V. & Britten M. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *Food Science and Technology*, 60:609-614, 2015.
- Fischer G., Conceição F.R., Leite F.P., Dummer L.A., Vargas G.D., Hübner S.O., Dellagostin O.A., Paulino N., Paulino A.S. & Vidor T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25:1250-1256, 2007.
- Funari C.S. & Ferro V. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26:171-178, 2006.
- González M., Guzmán B., Rudyk R., Romano E. & Molina A.A. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22:243-248, 2003.
- Kumazawa S., Goto H., Hamasaka T., Fukumoto S., Fujimoto T. & Nakayama T. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68:260-262, 2004.
- Langoni H., Domingues P.F., Funari S.R.C., Chande C.G. & Neves I. R. Efeito antimicrobiano *in vitro* da própolis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 48:227-229, 1996.
- Marcucci M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19:529-536, 1996.
- Marcucci M.C., De Camargo F.A. & Lopes C.M.A. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74:105-112, 2001.
- Marcucci M.C. & Bankova V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Topics in Phytochemistry*, 2:115-123, 1999.
- Ortega N.S., Campo N.B. & Cabezas-Fajardo F.A. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propoleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Artículos de Investigación Científica y Tecnológica*, 9:8-16, 2011.
- Paulino P., Scrimim F.M., Raichaski L.B., Marcucci M.C., Scrimim A.C. & Calixto J.B. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea *in-vitro*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54:845-852, 2002.
- Pereira A.S., Seixas F.R.M.S. & Aquino Neto F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25:321-326, 2002.
- Picoli T., Zani J.L., Bandeira F.S., Roll V.F.B., Ribeiro M.E.R., Vargas G.D., Hubner S.O., Lima M., Meireles M.C.A. & Fischer G. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microorganismos em leite cru. *Semina: Ciências Agrárias*, 35:2471-2480, 2014.
- Picoli T., Zani J.L., Peter C.M., Roll V.F.B., Ribeiro M.E.R., Vargas G.D., Hubner S.O., Lima M. & Fischer G. Milk production characteristics in Southern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 36:1991-1998, 2015.
- Quinn P.J., Markey B.K., Leonard F.C., Fitzpatrick E.S., Fanning S. & Hartigan P.J. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed. Ames, Wiley-Blacwell, 2011. 1231p.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood W.C. & Hincliff K.W. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. 9^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2002. 1770p.
- Silva B.E.C.F., Maciel M.A.V., Melo F.L., Antas M.D.G.C., Neto A.M.B. & Rabelo M. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogênicos. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, 52:168-172, 2007.
- Singleton V.L. & Rossi J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16:144-158, 1965.
- Trabulsi L.R. & Alterthum F. *Microbiologia*. 5^a ed. Atheneu, São Paulo, 2005. 780p.
- Woisky R.G. & Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37:99-105, 1998.
- Vargas A.C., Loguercio A.P. & Witt N.M. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, 34:159-163, 2004.
- Vilela C.O., Vargas G.D., Fischer G., Ladeira S., Faria R.O., Nunes C.F., Lima M., Hübner S.O., Luz P., Osório L.G. & Anciuti M.A. Propolis: a natural product as an alternative for didinfection of embryonated eggs for incubation. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79:161-167, 2012.
- Watts J.L. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 16:41-66, 1988.
- Zhishen J., Mengcheng T. & Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64:555-559, 1999.