

# ANÁLISE DO EFEITO ANTIBACTERIANO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DA AMAZÔNIA ORIENTAL SOBRE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*

## ANALYSIS OF ANTIBACTERIAL EFFECT OF EASTERN AMAZON PROPOLIS EXTRACTS ON *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli*

AMANDA DA COSTA SILVEIRA<sup>1\*</sup>, FABYANNE SILVA DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, FERNANDA MARTINS BATISTA<sup>2</sup>, BRUNA FERREIRA DE CARVALHO<sup>2</sup>, NILSON VELOSO BEZERRA<sup>3</sup>, REGIS BRUNI ANDRIOLO<sup>4</sup>

1. Discente do curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia e Professora Mestra, do curso de graduação Medicina da Universidade do Estado do Pará; 2. Acadêmica do curso de graduação Biomedicina da Universidade do Estado do Pará; 3. Professor Doutor, Docente do Departamento de Patologia da Universidade do Estado do Pará; 4. Professor Doutor, Docente do Departamento de Saúde Comunitária da Universidade do Estado do Pará.

\* Travessa Perebebuí, nº 2623. Bairro: Marco, Belém, Pará, Brasil. CEP: 66087-670. [amanda.silveira@uepa.br](mailto:amanda.silveira@uepa.br)

Recebido em 26/02/2021. Aceito para publicação em 23/04/2021

### RESUMO

Produtos naturais são utilizados e pesquisados, pois podem apresentar propriedades biológicas favoráveis e alternativas terapêuticas frente às bactérias multirresistentes. A própolis é um composto natural complexo com diferentes propriedades biológicas, e sua composição sofre interferências da vegetação local, podendo, em decorrência disso, apresentar variação nas propriedades antibacterianas. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de extratos de própolis (EP) da Amazônia Oriental brasileira frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. EP alcoólico (EPA) e hidroalcoólico (EPHA) foram obtidos e avaliados em diferentes concentrações pelo método de macrodiluição em caldo. O metabolismo e o crescimento bacteriano foram observados para estabelecer a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Considerando as diferentes concentrações de EPA e EPHA, a ausência de metabolismo de *S. aureus* foi observada em 100% das amostras e a de crescimento em 99%. Observou-se ausência de *E. coli* em 100% das amostras para ambas as análises. A CIM e CBM foram de 5 mg/mL de EPHA frente as duas bactérias. Com os resultados de inibição bacteriana de extratos de própolis da Amazônia Oriental brasileira apresentarem efeitos antibacterianos, mesmo diluído em água, a própolis estudada, assim como a de outras regiões, possui potencial terapêutico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Própolis; extratos; antibacterianos; ecossistema Amazônico.

### ABSTRACT

Natural products present favorable biological properties, including as therapeutic alternatives against multi-resistant bacteria. Propolis is a complex natural compound with different biological properties, whose composition may be affected by local vegetation, leading to variation in its antibacterial properties. This study aims to evaluate the antibacterial effects of propolis extracts from the Eastern Amazon of Brazil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* via *in vitro* tests. Alcoholic (EPA) and hydroalcoholic

(EPHA) EP were obtained and evaluated in different concentrations by the broth macrodilution method. We observed bacterial metabolism and growth to establish the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). Considering the different EPA and EPHA concentrations, our results found the absence of metabolism by inhibiting *Staphylococcus aureus* in 100% of the samples and growth in 99%. We found no *E. coli* in 100% of the samples for both analyses. MIC and CBM was 5 mg/mL of EPHA against the two bacteria. With the results of bacterial inhibition of propolis extracts from the Brazilian Eastern Amazon showing antibacterial effects, even diluted in water, we can consider that the studied propolis extract present as much therapeutic potential as those from other regions.

**KEYWORDS:** Propolis; extract; anti-bacterial agents; Amazonian ecosystem.

### 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são substâncias ou compostos derivados de plantas ou animais. Sua utilização é uma prática do passado e é observada na atualidade de forma crescente, atribuída principalmente à hábitos de vida mais saudáveis, à busca por tratamentos menos agressivos ao organismo e por apresentarem propriedades biológicas favoráveis a fins terapêuticos<sup>1-3</sup>.

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002)<sup>4</sup> define Medicina Tradicional (MT) e Medicina Alternativa e Complementar (MAC) como práticas que incluem terapias com uso de produtos naturais. Estas são cada vez mais utilizadas como perspectivas nas práticas de terapias em virtude de adversidades correlacionadas às outras terapêuticas, como o acesso aos produtos terapêuticos e a resistência a antimicrobianos em diversas infecções, resistência considerada uma ameaça global em 2019. Além disso, os produtos naturais apresentam vantagens, como a facilidade de acesso, o baixo custo e a quantidade reduzida de efeitos colaterais

quando comparados aos alopatócos<sup>5-8</sup>.

Importantes políticas públicas na área da saúde foram implantadas no Brasil, destacando-se a implementação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). A partir de 2018, o Ministério da Saúde incluiu 10 novas práticas no rol das disponibilizadas pelo SUS, entre elas, a apiterapia, que consiste na utilização de produtos produzidos pelas abelhas, como a própolis, para fins terapêuticos<sup>9,10</sup>.

A própolis é um composto resinoso natural produzido pelas abelhas para proteção das colmeias. Sua produção é resultante de uma mistura de substâncias, como: ceras, secreções salivares, enzimáticas e de materiais coletados da vegetal próxima à colmeia. Por isso, sua composição química varia qualitativamente e quantitativamente de acordo com a flora (exsudatos das plantas, resina, cera, pólen e néctar), além de outros fatores, como o clima, a região geográfica, a espécie da abelha coletora, a época da colheita, a técnica de extração e o solvente utilizado para obtenção dos extratos<sup>1,11-15</sup>.

A composição complexa e heterogênea de diferentes tipos de própolis pode ter influência em características variadas, como as propriedades físicas, químicas e biológicas<sup>11,16</sup>. Dentre os estudos com Extratos de Própolis (EP) que apresentam resultados favoráveis para fins terapêuticos, observa-se a ação potencial antioxidante, antitumoral, antifúngica, e, principalmente, a ação antibacteriana<sup>16-20</sup>, anti-inflamatória e antiviral, como em estudos recentes frente ao SARS-CoV-2. Isto ocorre devido aos diferentes aspectos do mecanismo de infecção serem alvos potenciais para compostos encontrados na própolis, como observados no estudo pré-clínico de Berreta *et al.* (2020)<sup>21</sup>, em que a própolis promoveu imunorregulação de citocinas pró-inflamatórias, e nos resultados de parte de um ensaio clínico, no qual Silveira *et al.* (2021)<sup>22</sup> administraram própolis oral concomitante ao tratamento padrão do hospital em que os pacientes estavam internados e observaram redução dos dias de internação.

Devido à biodiversidade ecológica do Brasil, a composição da própolis brasileira varia. Desse modo, 13 grupos foram classificados e catalogados de acordo com a região geográfica de origem e características físico-químicas<sup>11,23,24</sup>. Os resultados do estudo realizado por Machado *et al.* (2016)<sup>16</sup> ampliam o conhecimento sobre a composição química e atividades biológicas de diferentes tipos de própolis do Brasil. Os autores destacaram que os extratos etanólicos de própolis vermelha tinham a atividade biológica mais alta em todos os testes realizados. Segundo Olegário *et al.* (2019)<sup>14</sup>, foram identificados em seus estudos um total de 315 compostos voláteis em diferentes própolis brasileiras. De acordo com o estudo, a análise e caracterização variaram significativamente e os autores confirmaram que estes dependiam da área geográfica de coleta da própolis.

O elevado efeito antibacteriano de diferentes extratos de própolis é observado frente à *Staphylococcus*

*aureus* e *Escherichia coli*, devido à inibição de metabolismo e do crescimento bacteriano<sup>1,15,25,26</sup>. Frequentemente presentes no microbioma humano de indivíduos saudáveis, essas bactérias podem causar desde infecções simples até doenças infecciosas mais graves. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva que pode provocar doenças transmitidas por alimento e alterações na pele, bem como se agregar ao biofilme dental supra gengival, causar pneumonia, abscesso, septicemia e endocardite<sup>27-31</sup>. Já a *Escherichia coli*, bactéria gram-negativa, além de poder se agregar ao biofilme dental, pode causar ou contribuir com infecções do trato urinário e intestinal, infecções alimentares, meningites e septicemias<sup>27,28,30,32,33</sup>.

Diante das informações citadas sobre: a terapêutica frente a microrganismos causadores de doenças infecciosas, a variabilidade e os resultados biológicos promissores da própolis; da ausência de registros encontrados na literatura científica referente ao potencial antibacteriano de própolis da região Norte do Brasil e ao seu uso popular regional; e, considerando-se o mérito e a importância de pesquisar a eficácia desse produto natural, este trabalho tem por objetivo avaliar *in vitro* os efeitos antibacterianos de diferentes concentrações de Extratos de Própolis alcoólicos e hidroalcoólicos da Amazônia Oriental brasileira sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Origem e obtenção dos Extratos de Própolis (EP)

A própolis bruta foi coletada em outubro de 2019, em uma colmeia de *Apis mellifera* (abelha com ferrão) localizada em um apiário no município de Primavera (latitude: 0°54'32.9"S, longitude: 47°06'46.4"W), estado do Pará, na região Norte e da Amazônia Oriental do Brasil. A vegetação principal entorno do apiário consiste em um ambiente de mangue com predominância de “anani” (*Symphonia globulifera*), “urucuba” (*Virola gardneri*) e “açazeiro” (*Euterpe oleracea*).

Para obtenção do Extrato de Própolis alcoólico (EPA), foi utilizada a proporção de 10 g de própolis bruta triturada em 90 mL de álcool cereal 80% (Agroindústria Tarumã Ltda, São Pedro do Turvo, Brasil). A solução foi armazenada em um recipiente de vidro escuro protegido com papel alumínio e Parafilm® (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos), homogeneizada sob agitação moderada por 5 minutos, 1 vez ao dia, durante 5 dias, e mantida por 45 dias em repouso para posteriormente ser filtrada em papel filtro.

Diferentes concentrações de EPA foram obtidas e, para cada extrato, diluições com água ultrapura (Farmace, Ultramega Distribuidora Ltda, Camarage, Brasil) foram realizadas na mesma proporção em volume, de 50/50 (álcool/água) para obtenção do Extrato de Própolis hidroalcoólico (EPHA). Oito grupos (G) de extratos foram testados: G1-EPA 10% (10% de própolis); G2-EPA 5% (5% de própolis); G3-EPA 1% (1% de própolis); G4-EPA 0.5% (0.5% de própolis); G5-

EPHA 10% (10% de própolis); G6-EPHA 5% (5% de própolis); G7-PHA 1% (1% de própolis), G8-EPHA 0.5% (0.5% de própolis).

### Efeitos antibacterianos

Foram utilizadas cepas de referência padrão *American Type Culture Collection* (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Laborclin, Pinhais, Brasil). As cepas foram cultivadas no Laboratório de Bacteriologia da Universidade do Estado do Pará, conforme recomendação do fabricante. As bactérias *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em meio ágar-sangue (Ágar Base Columbia (Himedia, Mumbai, Índia) suplementado com 5% de sangue de carneiro) e *Escherichia coli* em meio ágar Mac Conkey (Kasvi, Itália). As placas foram incubadas em estufa à temperatura de 35-37 °C por 24 horas<sup>34</sup>.

As atividades antibacterianas dos EP foram analisadas pela observação de ausência ou de presença do metabolismo celular para estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e pela observação do crescimento bacteriano para Concentração Bactericida Mínima (CBM) pelo método de macrodiluição em caldo e de acordo com as normas da NCCLS (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*), com adaptações.

As amostras foram dispostas em tubos na ordem decrescente de EPA com concentração de 100, 50, 10 e 5 mg/mL e de EPHA nas mesmas concentrações. Cada tubo continha 500 µL de EP, 500 µL do caldo de cultura *Trypticase Soy Broth* (Laborclin, Pinhais, Brasil), seguido da adição de 100 µL do inóculo bacteriano. Para cada experimento, a suspensão bacteriana era ajustada em solução salina (NaCl 0,85%) para obter uma turbidez equivalente a uma solução padrão de 2.0 de McFarland, contendo aproximadamente  $6 \times 10^8$  UFC/mL. O álcool cereal 80% também foi analisado (G9) para verificar a possível atividade do solvente, assim como a proporção de 50/50 com água ultrapura (G10).

Para garantir a confiabilidade dos resultados, foram realizados o semeio dos inóculos de cada experimento em ágar; os controles positivos (C1, também considerado G11), com caldo de cultura, inóculo bacteriano e água ultrapura; e os controles negativos (C2). As amostras foram agitadas por 10 minutos em velocidade de 100 rpm e incubadas à temperatura de 35-37 °C por 24 horas.

Para análise da CBM, alíquotas de 1 µL de cada amostra foram semeadas com alça bacteriológica descartável em ágar. As placas eram incubadas conforme especificação anterior. Após 24 horas, a ausência ou a presença de crescimento bacteriano era observado macroscopicamente por características superficiais de colônias de cada bactéria. Para as placas com crescimento, foi realizada a análise microscópica por Coloração de Gram.

Para análise da CIM, utilizou-se o método colorimétrico de metabolismo celular, com o uso da Rezasurina 7-hidroxi-3H-fenoxazina-3ona 10-óxido (Inlab, Diadema, Brasil) a 0.01%. Após o semeio das

amostras para CBM, em cada tubo foram acrescentados 150 µL de Resasurina e as amostras foram novamente incubadas à temperatura de 35-37 °C. Duas verificações foram realizadas durante o período de 24 horas. Após o período de incubação, por meio da leitura visual, as amostras foram classificadas de acordo com a coloração, com azul representando ausência de metabolismo e rosa, a presença de metabolismo celular.

Cinco experimentos foram realizados para cada bactéria, todos em triplicata, correspondendo ao total de 15 ensaios. Tal decisão foi baseada no maior número de eventos encontrados em publicações prévias relevantes e análogas aos objetivos propostos<sup>1,15</sup> e, mais especificamente, em Torres et al. (2018)<sup>13</sup>.

### Análise dos resultados

Para os resultados de cada bactéria, as análises primárias foram constituídas pela comparação das incidências dos efeitos antibacterianos entre os grupos combinados: aqueles com concentrações diferentes do mesmo EP (G1 a G4), (G5 a G8); aqueles independentemente do tipo de EP (G1 a G8) e aqueles independentemente da concentração, do tipo de EP e da presença de própolis (G1 a G10).

As análises secundárias foram constituídas pelas comparações de todos os grupos, independentemente da concentração, do tipo de EP, da presença de própolis e do solvente/diluinte (G1 a G11). Todas as comparações foram feitas de dois a dois, por meio do cálculo dos Riscos Relativos (RR), com respectivos qui-quadrados ( $\chi^2$ ) e intervalos de confiança a 95%, sendo assumidas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de comparação quando  $p < 0.05$ .

Para a análise terciária, considerou-se a média dos valores da CIM e CBM dos 15 ensaios, definidos como a menor concentração de EP com efeito inibitório antibacteriano devido à ausência da atividade bacteriana.

## 3. RESULTADOS

A própolis bruta da Amazônia Oriental brasileira apresenta coloração escura (Figura 1). Visualmente, os EPA resultaram em uma coloração límpida que, quanto maior a concentração de própolis, mais intensa. Observou-se, nos EPHA, turbidez opaca e leitosa, mais intensa quanto maior a concentração de própolis.

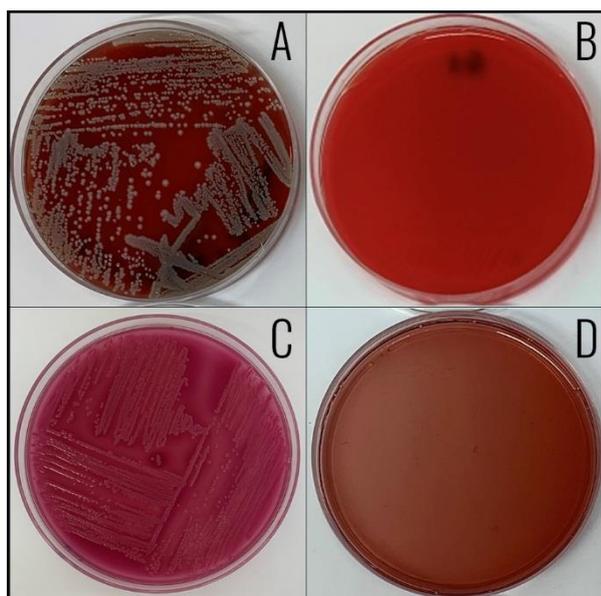
O desfecho microbiológico da atividade bacteriana é representado pelos resultados de um ensaio, conforme a descrição de cada análise. Nas análises dos efeitos antibacterianos, quanto ao tempo após o uso da Rezasurina, verificou-se que não houve diferença de resultado entre  $\pm 12$ h e 24h. Na análise do metabolismo celular (Figura 2), observa-se que os grupos de G1 ao G10 e o controle negativo (C2) apresentam coloração azul (ausência) e somente o controle positivo (C1) coloração rosa (presença); na análise do crescimento bacteriano (Figura 3), “A” e “B” de *Staphylococcus aureus*, “C” e “D” de *Escherichia coli*.



**Figura 1.** Própolis Bruta da Amazônia Oriental brasileira.  
**Fonte:** Próprio autor.



**Figura 2.** Desfecho microbiológico do metabolismo celular.  
**Fonte:** Próprio autor.



**Figura 3.** Desfecho microbiológico do crescimento bacteriano.  
**A:** Presença de crescimento de *Staphylococcus aureus*; **B:** Ausência de crescimento de *Staphylococcus aureus*; **C:** Presença de crescimento de *Escherichia coli*; **D:** Ausência de crescimento de *Escherichia coli*.  
**Fonte:** Próprio autor.

De 15 repetições para cada grupo experimental (G1 a G10), foi observada a ausência de metabolismo celular em todos os ensaios de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Quanto ao crescimento bacteriano, a ausência foi semelhante, com exceção de 1 amostra que ocorreu no grupo G3 (1/15, 6.66%), com presença de crescimento de *Staphylococcus aureus* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Desfecho microbiológico do metabolismo celular.

EXTRATOS SOLVENTES/DILUENTE	<i>Inibição Bacteriana</i>			
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Metabolismo n/N (%)	Crescimento n/N (%)	Metabolismo n/N (%)	Crescimento n/N (%)
<b>Extratos de Própolis alcoólico</b>	<b>60/60 (100%)</b>	<b>59/60 (98.3%)</b>	<b>60/60 (100%)</b>	<b>60/60 (100%)</b>
G1: EPA 10% - 100 mg/mL	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
G2: EPA 5% - 50 mg/mL	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
G3: EPA 1% - 10 mg/mL	15/15 (100%)	14/15(93%)	15/15(100%)	15/15(100%)
G4: EPA 0.5% - 5 mg/mL	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
<b>Extratos de Própolis hidroalcoólico</b>	<b>60/60 (100%)</b>	<b>60/60 (100%)</b>	<b>60/60 (100%)</b>	<b>60/60 (100%)</b>
G5: EPHA 10% - 100 mg/mL	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
G6: EPHA 5% - 50 mg/mL	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
G7: EPHA 1% - 10 mg/mL	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
G8: EPHA 0.5% - 5 mg/mL	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
<b>Solvente: Álcool</b>				
G9: Álcool Cereal 80%	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
<b>Solvente + Diluente</b>				
G10: Álcool + Água	15/15 (100%)	15/15(100%)	15/15(100%)	15/15(100%)
<b>Diluente: Água</b>				
G11: Água Ultrapura	0/15 (100%)	0/15 (100%)	0/15 (0%)	0/15 (100%)

Para as comparações entre grupos (G1 a G10), frente a inibição bacteriana por ausência de metabolismo e de crescimento de *Staphylococcus aureus*, não houve qualquer diferença estatística entre os grupos, o RR foi de 1.00 (IC 95% 0.88 - 1.13, p = 1.00). Somente as comparações envolvendo o G3 apresentaram RR de 0.97 (IC 95% 0.89 - 1.28, p = 0.47), sem diferença estatística também. A análise primária, conforme previamente planejada no método entre os grupos (G1 a G10), foi dispensada. Na análise secundária, todas as comparações dos grupos experimentais com o G11 resultaram diferença estatística significativa, de G1 a G10 (exceto G3), RR de 31 (IC 95% 2.02 - 475.12, p = 0.01), e comparações com o G3, RR de 29 (1.89 - 445.86, p = 0.02).

Para todas as comparações realizadas entre os grupos (G1 a G10) frente à *Escherichia coli*, não houve qualquer diferença entre os grupos comparados (RR 1,00; IC 95% 0.88, 1.13, p = 1,00) e, portanto, a análise primária foi dispensada. Na análise secundária, todas as comparações dos grupos experimentais com o G11 resultaram em diferença estatística significativa RR de 31 (2.02 - 475.12, p = 0.01).

Na análise terciária, observou-se que a CIM e CBM foi 5 mg/mL de EPHA, para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Figura 4).

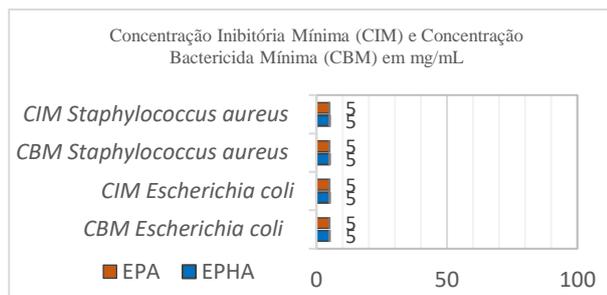


Figura 4. Valores da CIM e CBM dos Extratos de Própolis.

## 4. DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana da própolis vem sendo descritas contra diferentes patógenos que causam infecções leves e graves. Salientar a importância da pesquisa científica que investiga suas propriedades eleva o mérito da busca de alternativas para soluções com fins terapêuticos.

Berretta *et al.* (2020)<sup>21</sup>, em decorrência da pandemia da COVID-19 observaram que alguns aspectos da infecção por SARS-CoV-2 apresentaram mecanismo de ação que são alvos potenciais para compostos já observados em extratos de própolis. Assim sendo, os autores defendem que houve a redução do risco e de impactos da infecção e sugerem o uso da própolis como uma opção terapêutica promissora como adjuvante de tratamento. Sugestão observada de forma semelhante com os resultados obtidos por Silveira *et al.* (2021)<sup>22</sup>, quando administraram própolis oral de forma randomizada concomitante ao tratamento padrão de pacientes internados e observaram redução significativa dos dias de internação dos pacientes que fizeram o uso do composto. Esses estudos elucidam que a própolis é constantemente estudada e apresenta resultados biológicos promissores, com terapêuticas satisfatórias.

Ao se considerar a variabilidade de propriedades devido à complexidade da composição da própolis, destaca-se que a própolis brasileira apresenta diferentes colorações, compostos e atividades biológicas, como observado no estudo de Machado *et al.* (2016)<sup>16</sup>. Os autores avaliaram oito tipos de própolis brasileira e seus resultados corroboram com os de Olegário *et al.* (2019)<sup>14</sup>, que identificaram diferentes compostos em própolis de origem geográfica distinta. Evidencia-se a necessidade de mais estudos com própolis brasileira devido à biodiversidade ecológica do Brasil, à existência de 13 tipos catalogados e à ausência na classificação de registros de própolis com origem da região Norte<sup>11,23</sup>.

A própolis bruta utilizada neste estudo, da Amazônia Oriental brasileira, apresentou coloração escura, propriedade física semelhante a própolis do Grupo 3, do Paraná, Região Sul do Brasil, e dos Grupo 8 e 10 da Região Nordeste do Brasil, conforme os dados de Park *et al.* (2000)<sup>11</sup>.

Nos estudos de Nina *et al.* (2015)<sup>35</sup> e Górnjak *et al.* (2019)<sup>36</sup> foi observado que o EP é a forma mais utilizada desse composto e os solventes mais utilizados são o álcool, por apresentar melhor extração dos compostos, e a água<sup>26</sup>, por possíveis efeitos adversos do álcool<sup>37</sup>.

Assim, Extrato de Própolis hidroalcoólico (EPHA) seria ideal para o consumo humano, foi implicado para análise neste estudo a proporção de 50/50 devido aos melhores resultados encontrados frente às propriedades químicas e biológicas por Sun *et al.* (2015)<sup>38</sup> e Campos *et al.* (2020)<sup>15</sup>, assim, os resultados obtidos nesse experimento também mostraram resultados favoráveis e podem ser validados.

De acordo com os resultados obtidos, de G1 a G10, não houve qualquer diferença em relação à inibição bacteriana independentemente da análise e da bactéria, logo, a incidência do desfecho foi igual para EPA e EPHA. Assim, depreende-se que a exposição a determinado fator de concentração e de diluição não causou maior risco de presença bacteriana em relação à outra exposta. Considerando a ausência de efeito na inibição bacteriana observada do G11 independentemente da análise e da bactéria, indica-se que a exposição dos grupos (G1 a G10) foram fatores de proteção. Assim, EPA e EPHA apresentam o fator protetor frente a atividade bacteriana. É válido enfatizar que, além do ineditismo pelo tipo de própolis utilizada, as análises foram realizadas em triplicada e em cinco experimentos independentes, conforme método observado somente no estudo de Torres *et al.* (2018)<sup>13</sup>, fato que conferiu maior confiabilidade dos resultados por provável redução do erro  $\beta$ .

Em seus experimentos, Torres *et al.* (2018)<sup>13</sup> avaliaram que o EPA apresentou o efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* com aproximadamente a CIM de 1 mg/mL e 6 mg/mL, resultados próximos aos encontrados no presente estudo, mesmo se avaliado própolis do Sul do Brasil de duas abelhas. Ao se considerar a CIM de 5 mg/mL de EPA, observou-se que a CIM foi maior se confrontada com os resultados de Devequi-Nunes *et al.* (2018)<sup>1</sup> (de 0.2 à 0.8 mg/mL, com diferentes própolis do Brasil) e Campos *et al.* (2020)<sup>15</sup> (0.13 mg/mL, com própolis do Sudeste do Brasil). Referente a CBM, o resultado encontrado de 5 mg/mL, foi maior que os observados por Machado *et al.* (2016)<sup>24</sup> (com intervalo de 0.4 à >1.6 mg/mL, com diferentes própolis do Brasil) e Amarante *et al.* (2019)<sup>39</sup> (com 0.6 mg/mL, ao analisarem um EP comercial e um da Bahia).

De acordo com os resultados de Campos *et al.* (2020)<sup>15</sup>, a CIM de EP do Sudeste do Brasil sobre *Escherichia coli* foi de 4.3 mg/mL, dados que corroboram com os resultados obtidos no presente experimento, sugerindo a validade destes. Ao se considerar a CIM de 5 mg/mL de EPA, observou-se variação de concentração quando observados nos resultados de Torres *et al.* (2018)<sup>13</sup> com a média de  $\pm 8$  mg/mL e  $\pm 10$  mg/mL e os de Devequi-Nunes *et al.* (2019)<sup>1</sup>, de 0.4 à 1.6 mg/mL. Referente a CBM, o resultado encontrado de 5 mg/mL foi maior se confrontado com os resultados de Machado *et al.* (2016)<sup>24</sup>, no qual o observado foi de 0.8 à >1.6 mg/mL.

Com os resultados de EPA e EPHA, a CIM e CBM para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi de 5 mg/mL de EPHA. Dessa forma, mesmo diluído com água, o efeito antibacteriano por inibição de

metabolismo e de crescimento foi observado. Poucos estudos foram encontrados com EPHA e observou-se objetivos semelhantes somente no estudo de Campos *et al.* (2020)<sup>15</sup>, que apresentou CIM sobre *Staphylococcus aureus* de 2.15 mg/mL e para *Escherichia coli* 34.38 mg/mL, valores com maior diferença dos resultados encontrados, fato que pode ser atribuído às formas de obtenção dos extratos. Os EPHA do presente estudo foram extraídos com álcool cereal 80%, enquanto os do estudo citado não tiveram essa informação apresentada. Isto pode sugerir que o novo EP da Amazônia Oriental brasileira apresenta uma ação superior frente à *Escherichia coli* mesmo diluído em água. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para comprovação.

Os valores da CIM e CBM do presente estudo (5 mg/mL) foram a menor concentração testada. Microdiluições poderiam ser realizadas, no entanto, observou-se no estudo-piloto e no experimental que a inibição antibacteriana também era encontrada no grupo com álcool cereal 80% isolado (G9) e no grupo com a proporção de álcool cereal 80% com água ultrapura (G10). Portanto, devido a concentração 5 mg/mL corresponder à 0,5% de própolis e 99,5% líquido, realizar microdiluições com essa metodologia provavelmente não faria diferença. Esta é uma informação pouco observada e discutida na literatura e de grande relevância para realmente atribuir o potencial biológico aos EP pelo sinergismo dos compostos extraídos pelo álcool ou somente ao álcool, principalmente em extratos com proporção de própolis muito baixa.

Com base nos resultados obtidos e na literatura especializada, considera-se que as variações de resultados são devido à complexa composição da própolis e à falta de padronização entre os estudos. Este fato pode atribuir algumas limitações às correlações, assim como a falta de algumas informações. Destaca-se neste estudo, o comprometimento e a originalidade, ao ser o primeiro a avaliar a propriedade biológica antibacteriana de própolis com origem da Amazônia Oriental brasileira. Limitações ocorreram devido ao cenário da pandemia; as atividades laboratoriais foram temporariamente suspensas, mas almeja-se o breve retorno para a continuidade de mais análises, como as de diferentes volumes de diluentes, além de comparações com própolis de origem diferente.

Ao se considerar que a própolis utilizada nos extratos desse estudo pode apresentar ou contribuir com os efeitos antibacterianos por não impedir a inibição do metabolismo e o crescimento das bactérias e que diversos estudos apresentaram resultados sobre o potencial farmacológico e os efeitos antibacterianos da própolis, sugere-se que mais estudos com EP dessa região brasileira devam ser realizados. Além disso, salienta-se a importância econômica e social deste estudo, pois a apicultura é uma atividade econômica local do município e que EPA são preparados e utilizados pela população da região. Sugere-se também mais experimentos com EPHA para avaliar diferentes proporções de volume entre álcool e água a fim de

possivelmente atribuir o efeito e o valor mínimo que os extratos podem ser diluídos sem perder o efeito, estabelecendo protocolos de orientação de uso com mais precisão desse composto natural tão utilizado pela população.

## 5. CONCLUSÃO

Conforme a metodologia proposta e a partir dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que os Extratos de Própolis da Amazônia Oriental brasileira, em diferentes concentrações e diluições, apresentam efeito antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por inibirem o metabolismo e o crescimento bacteriano.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos apicultores do apiário de Primavera por fornecer os EP, representados por Joelma Nunes, Presidente da Cooperativa de Agricultores Familiares de Primavera - Pará.

## 7. REFERÊNCIAS

- [1] Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto GA, *et al.* Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. PLoS One. 2018; 13(12):1-20.
- [2] Sorokina M, Steinbeck C. Review on natural products databases: Where to find data in 2020. J Cheminform. 2020; 12(1):1-51.
- [3] Lahlou M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. Pharmacology & Pharmacy. 2013; 4(3):17-31.
- [4] Organização Mundial da Saúde (OMS). Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. Genebra: OMS 2002.
- [5] Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS - Notícias [Internet]. [acesso 20 jan. 2021]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset\\_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms/219201/pop\\_up?\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_viewMode=print&\\_101\\_INSTANCE\\_FXrpx9qY7FbU\\_languageId=en\\_US](http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US)
- [6] Lana GEP, Oliveira MC, Balmant TMM. Resistência Bacteriana: Perfil de resistência da bactéria *Staphylococcus aureus* em pacientes ambulatoriais no município de Ipatinga/Mg. Braz. J. Surg. Clin. Res. 2017; 18(2):45-48.
- [7] Furtado DMF, Silveira VS, Carneiro ICRS, *et al.* Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. Rev Pan-Amazônica Saúde. 2019; 10(0):1-8.
- [8] Bryce A, Hay AD, Lane IF, *et al.* Global prevalence of antibiotic resistance in paediatric urinary tract infections caused by *Escherichia coli* and association with routine use of antibiotics in primary care: Systematic review and meta-analysis. BMJ. 2016; 352:1-10.
- [9] Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. 1ª ed. Brasília: Ciência & Saúde Coletiva; 2006.
- [10] Ministério da Saúde inclui 10 novas práticas

- integrativas no SUS [Internet]. [acesso 20 jan. 2021]. Disponível em : <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42737-ministerio-da-saude-inclui-10-novas-praticas-integrativas-no-sus>
- [11] Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*. 2000; 58(1):2-7.
- [12] Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review. *Chem Cent J*. 2014; 8(1):1-8.
- [13] Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT, *et al.* Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *tetragonisca angustula* stingless bees. *Brazilian J Med Biol Res*. 2018; 51(6):1-10.
- [14] Olegário LS, Andrade JKS, Andrade GRS, *et al.* Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. *Food Res Int*. 2019; 123:481-502.
- [15] Campos JV, Assis OBG, Bernardes-Filho R. Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*. *Food Sci Technol*. 2020; 40(1):55-61.
- [16] Machado BAS, Silva RPD, Barreto GDA, *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One*. 2016; 11(1):1-26.
- [17] Araújo KSS, Santos Júnior JF, Sato MO, *et al.* Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amaz*. 2016; 46(1):61-8.
- [18] Martorano-Fernandes L, Cavalcanti YW, Almeida LDFD. Inhibitory effect of Brazilian red propolis on *Candida* biofilms developed on titanium surfaces. *BMC Complement Med Ther*. 2020; 20(1):1-9.
- [19] Sokeng SD, Talla E, Sakava P, *et al.* Anti-Inflammatory and Analgesic Effect of Arachic Acid Ethyl Ester Isolated from Propolis. *Biomed Res Int*. 2020; 2020:1-8.
- [20] Juanes CDC, Souza SM, Nogueira V, *et al.* Própolis vermelha e L -lisina na angiogênese e no crescimento tumoral em novo modelo de bolsa jugal de hamster inoculada com células de tumor de Walker 256. 2019; 17(2):1-7.
- [21] Berretta AA, Silveira MAD, Capcha JMC, *et al.* Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. *Biomed Pharmacother* 2020; 131:1-16.
- [22] Silveira MAD, Jong DD, Galvao EBS, *et al.* Efficacy of propolis as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: a randomized, controlled clinical trial. *medRxiv*. 2021; 2021.01.08.20248932.
- [23] Dausch A, Moraes CS, Fort P, *et al.* Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2008; 5(4):435-41.
- [24] Machado CS, Mokochinski JB, Lira TO De, *et al.* Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2016; 2016:1-11.
- [25] Pobjega K, Kraśniewska K, Derewiaka D, *et al.* Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J Food Sci Technol*. 2019; 56(12):5386-95.
- [26] Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial properties of propolis. *Molecules*. 2019; 24(2047):1-17.
- [27] Schaub N, Boldanova T, Noveanu M, *et al.* Incremental value of multiplex real-time PCR for the early diagnosis of sepsis in the emergency department. *Swiss Med Wkly*. 2014; 144:1-10.
- [28] Thurnheer T, Belibasakis GN. Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. *Virulence*. 2015; 6(3):258-264.
- [29] Abdallah L, Habib G, Remadi JP, *et al.* Comparaison du pronostic des l'endocardites sur prothèse valvulaire à staphylocoque doré et à un autre germe. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016; 109(10):542-549.
- [30] Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Brasília: Secr Vigilância em Saúde. 2019;1-16.
- [31] Lima MFP, Borges MA, Parente RS, *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. *Uningá*. 2015; 21(1):32-9.
- [32] Souza CO, Melo TRB, Melo CSB, *et al.* *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarréiogênica versátil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2016;7(2):79-91.
- [33] Reis ALO, Vasconcelos JS, Santos LG, *et al.* *Escherichia coli* na infecção do trato urinário em mulheres. *Braz. J. Surg. Clin. Res*. 2017; 20(1):122-127.
- [34] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Agência Nac Vigil Sanit. 2013; 9(5):1-100.
- [35] Nina N, Quispe C, Jiménez-Aspee F, *et al.* Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the Región del Maule, central Chile. *Molecules*. 2015; 20(10):18144-67.
- [36] Gómiak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Rev*. 2019; 18:241-72.
- [37] Kubiliene L, Laugaliene V, Pavilonis A, *et al.* Alternative preparation of propolis extracts: Comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15(1):1-7.
- [38] Sun C, Wu Z, Wang Z, *et al.* Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2015; 2015:1-9.
- [39] Amarante JF, Ribeiro MF, Costa MM, *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. and multiresistant bacteria. *Pesqui Vet Bras*. 2019; 39(9):734-743.