

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA SP*

GESIANE FERRO FERNANDES
CAROLINE BARCELOS COSTA

Curso de Farmácia da Escola de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória – Emescam.
Departamento de Microbiologia e Imunologia, Av. Nossa Senhora da Penha nº 2190, Santa Luíza,
Cx. Postal 5135, 29045-402, Vitória, ES.

Autor Responsável: G.F. Fernandes. E-mail: gesianefernandes@gmail.com

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida sp.* compreende 200 espécies conhecidas⁹, mas somente uma dezena de espécies possui a faculdade de adaptar-se à temperatura de 37°C, podendo ser, ocasionalmente, patogênicas para o homem. Entre elas, estão: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parakrusei*, *C. zeylanoidea*, *C. stellatoidea* e *C. brumptii*¹⁸.

A candidíase é a principal infecção fúngica oportunista do ser humano, causada por leveduras do gênero *Candida sp.*, que fazem parte da microbiota endógena do corpo humano. Por isso, podem acometer hospedeiros saudáveis, mas a maioria das candidíases se desenvolve em indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes infectados pelo HIV, os que receberam transplante de um órgão, os que fazem tratamento com citostáticos, corticóides e tratamento prolongado com antibacterianos de amplo espectro. Além disso, o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos invasivos, como o cateterismo, abrem portas para a invasão^{2, 5, 14, 17, 18}.

As formas clínicas podem ser cutânea, mucosa e sistêmica. Na candidíase mucosa, os tecidos mais atingidos são os da boca e da vagina. Na sistêmica, a infecção pode atingir diversos órgãos, causando candidíase pulmonar, endocardite, nefrite e fungemia^{9, 14}.

O uso indiscriminado de antimicrobianos químicos sintéticos tem levado à seleção de microorganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos²⁶. O fluconazol, antimicótico usado na prevenção e tratamento de candidíase orofaríngea, tem sido associado ao aparecimento de resistência secundária das espécies isoladas²⁵.

Entre as pacientes com candidíase vulvovaginal tratadas com drogas azólicas, 5 a 20% apresentam recidivas¹².

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas é incerta. Esse contexto tem transformado os antimicrobianos naturais em uma alternativa eficaz e econômica²⁶.

A própolis é conhecida, desde a Antiguidade, por suas propriedades biológicas, tendo atividade antibacteriana,

antifúngica, antiinflamatória, analgésica, cicatrizante, antioxidante, antiviral, antiprotzoários, anestésica, imunestimulante, e, até mesmo, anti-tumoral^{1, 6, 16, 21, 26}.

A grande variedade de seu uso deve-se a multiplicidade de seus componentes que varia de acordo com as diferentes zonas geográficas, climáticas, e especialmente, com as espécies vegetais visitadas pelas abelhas^{1, 19, 22}. Alguns componentes estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis colhidas de espécies particulares de plantas. Mais de 210 componentes diferentes já foram identificados, em amostras de origens diversas, dentre eles: ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis, di-hidroflavonóis, etc.), terpenos, L-esteróides, aldeídos e alcoóis aromáticos, sesquiterpenos, naftaleno, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e substâncias inorgânicas^{1, 26}.

A pesquisa sobre a origem botânica da própolis verde produzida por abelhas africanas (*Apis mellifera*) em regiões de cerrado, no sul, na zona da mata e em áreas antrópicas do Estado de Minas Gerais foi iniciada em 1996 e concluída após dois anos. A pesquisa apontou a família da planta que serve de base à produção da própolis verde. As abelhas utilizam a planta conhecida popularmente por alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), uma espécie tipicamente brasileira, não adequada a outros países⁷.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis verde contra espécies de *Candida sp.* de origem clínico humano, através do método de diluição em ágar, na concentração de 15 mg/ml.

MATERIAL E MÉTODOS

Extrato de própolis

Foi utilizada amostra proveniente da cidade de Itatiaiuçu (MG). Aproximadamente 30 g de própolis verde bruta foram adicionadas a 100 ml de álcool 70° GL e deixada sob maceração por 10 dias, em temperatura ambiente, na ausência de luz e com agitação diária por 10 minutos. Após o prazo, o extrato foi filtrado e armazenado na ausência de luz.

Microrganismos

Foram testados dez microrganismos isolados de origem clínico humano: 1 de *Candida guilliermondii*, 1 de *Candida albicans* ATCC, 1 de *Candida glabrata* ATCC, 1 de *Candida kefyr*, 1 de *Candida humicola*, 1 de *Candida zeylanoides*, 1 de *Candida parapsilosis*, 1 de *Candida famata*, 1 de *Candida krusei* ATCC e 1 de *Candida tropicalis* ATCC.

As cepas padrão (ATCC) são originárias da Fiocruz, e as demais são originárias do Hospital Universitário Antônio Pedro. Todas foram doadas pela Universidade Federal Fluminense (UFF).

Teste de sensibilidade

Inóculo: Cada isolado de *Candida sp.* foi cultivado em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 24 horas. Após a incubação, três a cinco colônias de cada cultura foram suspensas em 5 ml de ágar BHI tendo a turbidez ajustada a 0,5 da escala McFarland.

Diluição em ágar: As placas foram preparadas com 19 ml de ágar Sabouraud dextrose e 1ml de extrato de própolis, obtendo-se placas com concentração de 15 mg de própolis por ml de ágar. O extrato de própolis foi adicionado ao ágar Sabouraud estéril à temperatura de 50°C, homogeneizado e distribuído em placas de Petri estéreis.

As placas foram inoculadas usando swab estéril e incubadas a 37°C por 24 horas. Os isolados foram considerados sensíveis ao extrato de própolis, quando não ocorreu crescimento visível de *Candida sp.* nas placas.

Para controle negativo do solvente foram preparadas placas com 19 ml de ágar e 1ml de álcool 70° GL. O solvente foi considerado inerte quando houve crescimento visível de *Candida sp.* nas placas após 24 horas de incubação a 37° C.

Para controle do inóculo, foram preparadas placas somente com ágar Sabouraud dextrose. Estas foram semeadas com o mesmo inóculo usado nos dois testes anteriores. O inóculo foi considerado aprovado quando houve crescimento visível de *Candida sp.* nas placas após 24 horas de incubação a 37° C.

RESULTADOS

Todos os isolados de *Candida sp.* cresceram sobre as placas que continham apenas ágar Sabouraud dextrose, indicando que o inóculo estava em perfeitas condições para a realização do teste de sensibilidade e do controle negativo do solvente.

No teste de controle negativo do solvente, houve crescimento visível de todos os isolados de *Candida sp.* mostrando que o solvente não exerceu efeito inibitório sob as condições do teste.

Quanto ao teste de sensibilidade, todos os isolados de *Candida sp.* mostraram-se sensíveis ao extrato alcoólico de própolis, não havendo crescimento visível sobre as placas após 24 horas de incubação a 37°C.

DISCUSSÃO

O álcool 70° GL é referenciado, em vários trabalhos, como líquido extrator mais apropriado para a própolis. Sawaya et al.²³ concluíram que os extratos obtidos usando etanol 30% continham somente os componentes mais polares da própolis. Aqueles obtidos usando etanol 50% continham outros componentes menos polares e aqueles obtidos usando etanol 70% eram similares àqueles extraídos com álcool absoluto e álcool de cereais.

Em outro estudo, Sawaya et al.²² encontraram valores de MIC que indicam que o efeito inibitório da própolis sobre as cepas de *Candida sp.* testadas deve-se a substâncias que são extraídas com mais eficiência usando-se solvente com 50% ou mais de etanol. Além disso, Santos et al.²¹ sugerem, em seu estudo, a utilização de alcoólatura 70% como a ideal para a obtenção de tinturas de própolis.

O método de diluição em ágar é o mais satisfatório para testes de sensibilidade. Sawaya et al.²² compararam quatro métodos de análise da atividade do extrato de própolis, com diferentes composições, contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. lusitanae*, *C. stellatoidea* e *C. parapsilosis* e concluíram que a diluição em ágar mostra resultados mais claros, sendo encontrados valores de concentração inibitória entre 6 e 12 mg/ml.

Stepanovic et al.²⁴ também concluíram que a diluição em ágar é o método mais preciso, trabalhando com *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*.

Ota et al.¹⁶ investigaram a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico da própolis brasileira contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*, verificando que 65% dos isolados testados não cresceram em diluições entre 9 e 10 mg/ml.

Fernandes Jr.¹¹ usando o método de diluição em ágar avaliou a atividade da própolis sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, encontrando valores de concentração inibitória entre 0,8 e 11 mg/ml.

Os resultados do presente estudo são concordantes com os resultados apresentados pelos autores citados, visto que todos os isolados testados mostraram sensibilidade ao extrato alcoólico de própolis através do método de diluição em ágar com concentração de 15 mg de própolis por ml de ágar.

CONCLUSÃO

Concluímos que o método de diluição em ágar mostra resultados claros e precisos, que o álcool 70° GL não exerce atividade inibitória sobre as espécies de *Candida sp.* avaliadas, quando realizado teste nas condições expostas no presente estudo. E que todos os isolados testados são sensíveis, "in vitro", ao extrato alcoólico de própolis verde na concentração de 15 mg/ml, pois não observamos crescimento visível de *Candida sp.* sobre as placas após incubação a 37°C por 24 horas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Professora Norma Lúcia Santos Raymundo, aos Professores do Departamento de Micologia e Bacteriologia da UFF, aos funcionários do Laboratório de Microbiologia da EMESCAM e ao Sr. Adilson da Silva.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, E. C. de; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.8, n.2, p.191-212, 2002.
2. ANDREU, Carlos Manuel Fernández; MEDINA, Yamilé Echemendia; GONZALEZ, Tahamara Cartaya *et al.* Sensibilidad in vitro a la nistatina de aislamientos vaginales de *Candida spp.* *Rev Cubana Med Trop*, v.53, n.3, p.194-198, sep./dic. 2001.
3. AZEVEDO, Rosa Vitória Palamin; KOMESU, Marilena Chinalli; CANDIDO, Regina Célia *et al.* *Candida sp* na cavidade bucal com e sem lesão: diluição inibitória máxima de Própolis e Periogard. *Rev. Microbiol*, v.30, n.4, p.335-341, out./dez. 1999.
4. CASTANEDA-PLIEGO, Amanda; YAÑEZ-VIGURI, Antonio; LOPEZ-VALLE, Tiburcio; TORRE, Francisco Valdes de La. Prevalência y sensibilidad de *Candida albicans* en cultivos obtenidos en un hospital oncológico. *Gac Med Mex*, v.136, n.3, p.193-199, mayo/jun. 2000.
5. COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v.36, n.5, p.599-607, set./out. 2003.
6. DÍAZ, Juan C. Quintana; RODRÍGUEZ, Olga Alonso; VELÁZQUEZ, Mirtha Díaz; MILIÁN, Milaig Lopez. Empleo de la tintura de própolis al 5 % en la cura de heridas sépticas faciales. *Rev. Cubana Estomatol*, v.34, n.1, p.25-27, ene./abr.1997.
7. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/9/propolis.html>> Acesso em 31/08/2004.
8. Disponível em: <www.mycology.adelaide.edu.au/Mycoses/Cutaneous/Candidiasis/index.html> Acesso em 12/04/05.
9. Disponível em : <www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/mycoses.htm> Acesso em 19/03/2005.
10. FERNANDES Jr., A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H. *et al.* The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.7, n.2, p.173-182, dez. 2001.
11. FERNANDES Jr., A.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L. *et al.* In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.1, n.2, p.63-69, 1995.
12. GALLE, Leonilda Chiari; GIANINNI, Maria José Soares Mendes. Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, v.40, n.4, p.229-236, ago. 2004.
13. MACHIN, Gerardo Martinez; LANCHI, Mayda Perurena; CARVAJAL, José Nunez *et al.* Aislamiento, identificación y tipificación de leveduras en pacientes VIH positivos con candidiasis oral. *Rev Cubana Med Trop*, v.49, n.3, p.174-180, sep./dic. 1997.
14. MENEZES, Everardo Albuquerque; GUERRA, Anne Cristina Pinheiro; RODRIGUES, Rita de Cássia Barros *et al.* Isolamento de *Candida spp.* no mamilo de lactantes do banco de leite humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, v.40, n.5, p.299-305, out. 2004.
15. ORTEGA, J.R.; TARRAGÓ, J.M.; LUGONES, H.M.; GARAY, J.C.S. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. *Rev Cubana de Estomatol*, mayo/ago. 2002.
16. OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, v.44, n.9-10, p.375-378, nov. 2001.
17. PANIZO, M.M. REVIÁKINA, V. *Candida albicans* e su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*, v.21, n.2. p.38-45, jul./dic. 2000.
18. PARDI, Germán; CARDOZO, Elba Inéz. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta. odontol. Venez*, v. 40, n.1, p.9-17, ene. 2002.
19. RODRÍGUEZ, Remigio Cortés; MONTEAGUDO, Geidy Lorenzo; DONATO, Antonio Perez; MARTINEZ, Rafael Sosa; SUÁREZ, Osaisa Saíenz. Irritabilidad dérmica primaria de cosméticos elaborados a partir de própolis. *Medicentro*, 2003, v.7, n.1, 2003.
20. ROSA, Maria Inês da; RUMEL, Davi. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, v.26, n.1, p.65-70, jan./fev. 2004.
21. SANTOS, C.R. dos; ARGENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Rev. Bras. Farmacogn*, v.13, supl., p.71-74, 2003.
22. SAWAYA, A.C.; PALMA, A.M.; CAETANO, F.M.; MARCUCCI, M.C.; DA SILVA CUNHA, I.B.; ARAUJO, C.E.; SHIMIZU, M.T. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol*, v.35, n.3, p.203-207, 2002.
23. SAWAYA, Alexandra C. H. F.; SOUZA, Kirllian S.; MARCUCCI, Maria C. *et al.* Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. *Braz. J. Microbiol*, v.35, n.1-2, p.104-109, jan./june 2004.
24. STEPANOVIC, S., ANTIC, N., DAKIC, I., SVABIC-VLAHOVIC, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res*, v.158, n.4, p.353-357, 2003.
25. TAPIA P, Cecilia; GONZALEZ A, Patricia; PEREIRA A, Angélica *et al.* Susceptibilidad antifúngica de *Candida albicans* recuperadas de pacientes con SIDA y candidiasis orofaríngea y esofágica: Experiencia con Etest®. *Rev. méd. Chile*, v.131, n.5, p.515-519, maio 2003.
26. VARGAS, Agueda Castagna de; LOGUERCIO, Andrea Pinto; WITT, Niura Mazzini *et al.* Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. *Cienc. Rural*, v.34, n.1, p.159-163, jan./feb. 2004.