

**AVALIAÇÃO *In vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRÓPOLIS
VERMELHA FRENTE AO *Propionibacterium acnes***

Hérick Hebert da Silva Alves¹; Maria Natália Campos Luz²; Edmir Geraldo de Siqueira
Fraga³

¹Discente do curso de Farmácia do Centro Universitário Católica de Quixadá.

E-mail: herick_hebert@hotmail.com

²Farmacêutica pelo Centro Universitário Católica de Quixadá.

³Docente do curso de Farmácia do Centro Universitário Católica de Quixadá.

E-mail: edmirfraga@unicatolicaquixada.edu.br

RESUMO

A acne é a mais comum das doenças crônicas do folículo pilosebáceo da pele humana, levando ao aparecimento de lesões polimorfos. Dentre os fatores desencadeantes, além do fator genético, o fator hormonal contribui para que ocorra a hipersecreção sebácea que leva a obstrução do folículo piloso e consequente proliferação de microrganismos, representados principalmente pelo *Propionibacterium acnes*, o que o torna um importante alvo terapêutico. A própolis vermelha possui atividade antimicrobiana evidente contra as bactérias gram-positivas. Objetiva-se neste trabalho, avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis vermelha em forma de extrato etanólico frente ao *Propionibacterium acnes*, com determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC₅₀ e MIC₉₀). Trata-se de um estudo quantitativo, descritivo e experimental, a ser realizado no laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola do Centro Universitário Católica de Quixadá, no período de novembro a dezembro de 2017. Será selecionada a cepa de *Propionibacterium acnes* ATCC®1969. Partindo-se da concentração de 64% de extrato etanólico de própolis vermelha, será realizada uma macrodiluição até a concentração de 0,03%, com posterior inoculação da bactéria, respeitando-se os períodos de incubação. Os tubos serão vedados com vaselina líquida estéril e os ensaios serão realizados em duplicata. As MICs serão determinadas mediante leitura visual dos tubos, considerando como a menor concentração de extrato de própolis vermelha onde não se visualizar crescimento microbiano. Para controle de qualidade será usado resazurina. Espera-se conhecer a ação da própolis vermelha em forma de extrato etanólico frente ao *Propionibacterium acnes*, tendo em vista que este patógeno apresenta características de suscetibilidade.

Palavras-chave: Ação Antimicrobiana. Acne. *Propionibacterium acnes*. Própolis.

INTRODUÇÃO

A acne é a mais comum das doenças crônicas do folículo pilosebáceo da pele humana, levando ao aparecimento de vários tipos de lesões. Dentre os fatores desencadeantes, além do fator genético, o fator hormonal contribui para que ocorra a hipersecreção sebácea que leva a obstrução do folículo piloso e consequente proliferação de microrganismos, representados principalmente pelo *Propionibacterium acnes* (GOMES; DAMAZIO, 2009, p. 40; ZAENGLIN; THIBOUTOT, 2015, p. 545).

O *Propionibacterium acnes* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia, que faz parte da microbiota normal residente na pele. Os níveis de *Propionibacterium acnes* alcançam valores máximos ao final da adolescência e início da idade adulta e estão presentes, principalmente, em regiões do corpo ricas em glândulas sebáceas, como a face e o couro cabeludo. O

Propionibacterium acnes pode atuar na fisiopatologia da acne liberando enzimas que contribuem com a ruptura da parede folicular e também estimulando a resposta inflamatória (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014, p. 340-343).

O uso de produtos naturais em dermatologia está se tornando cada vez mais comum. Substâncias como a própolis, coletada por abelhas, tem despertado o interesse de muitos pesquisadores em decorrência de suas inúmeras propriedades terapêuticas, como: cicatrizantes, antimicrobianas, anestésicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e anticancerígenas (JARDIM; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2014).

A própolis vermelha possui atividade antimicrobiana evidente contra bactérias gram-positivas, sua principal forma de utilização é como extrato alcoólico, sendo largamente utilizada para fins terapêuticos e farmacológicos em humanos. A ação antibacteriana da própolis vermelha está diretamente relacionada a sua composição química, com destaque aos compostos fenólicos. Estes compostos apresentam mecanismos bacteriostáticos, e em altas concentrações bactericidas, podendo haver uma variabilidade de interações decorrentes da sensibilidade de cada grupo de bactéria (SOUZA, 2009; CARVALHO; BALTAZAR; AGUIAR, 2015; SILVA et al., 2015).

Frente a essa realidade, surgem os questionamentos: A própolis vermelha na forma de extrato etanólico possui atividade antibacteriana contra o *Propionibacterium acnes*? Qual concentração de própolis vermelha em forma de extrato etanólico apresenta melhor atividade antibacteriana? A busca por produtos de fontes naturais com atividades antibacterianas é constante, tendo em vista que geralmente apresentam menores chances de causar efeitos adversos e/ou induzir resistência bacteriana. Diante disso, estudar a atividade de compostos naturais com ação antimicrobiana, como a própolis vermelha, ganha cada vez mais importância.

Objetiva-se neste trabalho, avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis vermelha em forma de extrato etanólico frente ao *Propionibacterium acnes*, com determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC₅₀ e MIC₉₀).

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo quantitativo, descritivo e de caráter experimental, que será realizado no laboratório de Controle de Qualidade da Farmácia Escola do Centro Universitário Católica de Quixadá, no período de novembro a dezembro de 2017. De acordo com as Condições do laboratório e viabilidade da cepa e do extrato de Própolis vermelha.

A significância estatística dos dados será estipulada em 5% ($p < 0,05$). Para análise dos dados será utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 22.0 para Windows.

Na primeira etapa, será selecionada a cepa de *Propionibacterium acnes* ATCC®1969 que será ativada diretamente em caldo de tioglicolato sem indicador semeado 20µL desta suspensão em placas com meio de cultura Reinforced Clostridial Médium e/ou Reinforced Clostridial Agar (Himedia) e incubadas 48 horas a 37° C em anaerobiose que será gerada utilizando-se geradores Anaerogen® (Oxoid) em jarras de acrílico.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), realizada através da técnica de macrodiluição, conforme padronizado pelo Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), documento M11-A8.

Para o extrato etanólico será preparada uma série com 12 tubos de ensaio contendo 3mL do caldo de tioglicolato em uma estante de ensaio. Em seguida, será distribuído 3mL da solução de extrato etanólico a 64% no primeiro tubo, obtendo-se a concentração de 32% a partir dessa concentração serão feitas as diluições seriadas à razão 2 dos tubos 2 a 12, obtendo-se as concentrações de 64% a 0,03%.

Em seguida, será adicionado a cada tubo 50µL do inóculo (≈ 750.000 UFC/mL). O inóculo bacteriano será preparado a partir da suspensão de células de crescimento recente (24 horas) em caldo tioglicolato sem indicador, sendo a densidade ótica acertada até turbidez correspondente a com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL), leitura em espectrofotômetro 625nm, absorvância entre 0,08 e 0,1. Serão adicionadas 3 gotas de vaselina líquida estéril em cada tubo com o objetivo de vedar os tubos, uma vez que a bactéria possui características anaeróbias. Os ensaios serão realizados em duplicata e incubados a 37°C durante 48 horas.

Após o tempo de incubação será realizada leitura visual, pela ausência ou presença de crescimento de *Propionibacterium acnes* através de formação de colônias. Serão aceitos intervalos de MICs de ± 01 diluição por todas MICs, de modo a permitir critérios interpretativos entre as MICs de Própolis Vermelha e de antimicrobianos Benzilpenicilina e Vancomicina, estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) documento 5.16b. Intervalos de ± 2 diluições entre o primeiro e o segundo lotes de testes serão descartados e repetidos.

A execução de testes de sensibilidade e os procedimentos serão realizados em duplicata, sendo 05 isolados processados a cada lote de testes, somando ao todo 50 testes aplicados. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) será considerada como a menor concentração de extrato de própolis vermelha onde não se visualizar crescimento microbiano.

Após a incubação e leitura da MIC serão adicionados 50µL de resazurina (0,01%) e incubado novamente por 2 horas. Em seguida, será realizada uma nova leitura. A resazurina é um indicador de óxido redução, utilizado para revelar alteração de pH no meio determinado pelo crescimento bacteriano.

Os tubos que adquirirem uma coloração rosada indicam a reação química de óxido-redução da resazurina em resorufurina, sendo interpretada como presença de células viáveis, enquanto que nas cavidades onde não há mudança na coloração do corante, interpreta-se como ausência de células viáveis, indicando inibição do crescimento celular pelo extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *Propionibacterium acnes* desempenha papel dominante na segmentação dos queratinócitos e glândulas sebáceas do folículo pilosebáceo, contribuindo para o desenvolvimento de hiperseborreia e no desenvolvimento de comedões. A melhor compreensão do papel do *Propionibacterium acnes* abre novas perspectivas para o desenvolvimento de novos tratamentos (BEYLOT et al., 2013).

A acne não está relacionada diretamente com a efetividade da limpeza da pele. A lesão se desenvolve no interior dos folículos sebáceos. Desta forma, a acne é tratada em um primeiro momento com aplicação de agentes de ação tópica e antibióticos. Eritromicina e clindamicina são usadas no tratamento (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014, p. 343).

A própolis tem sido amplamente utilizada na medicina popular devido aos seus componentes químicos especiais, farmacologia forte, propriedades e baixa toxicidade. Este amplo espectro de efeitos terapêuticos torna a própolis um potente candidato a vários cenários clínicos (TORETI et al., 2013).

É uma substância resinosa resultado da coleta de diferentes exsudatos vegetais, coletados por abelhas, útil na manutenção e segurança da colmeia. Esse produto tem despertado o interesse de muitos pesquisadores em decorrência de suas inúmeras propriedades terapêuticas, dentre elas: cicatrizante, antimicrobiana, anestésica, anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena (JARDIM; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2014).

A própolis vermelha apresenta ação antibacteriana mais evidente contra Gram-positivas o que está diretamente relacionado à sua composição química, com destaque aos ácidos

fenólicos e flavonoides. A resistência apresentada pelas bactérias Gram-negativas possivelmente está ligada a composição de suas membranas plasmáticas, com uma maior quantidade de lipídios e a presença de lipopolissacarídeo na parede celular, fator este determinante na patogênese, toxicidade e ainda capacidade antigênica desses microrganismos. Existe a possibilidade de os compostos fenólicos ativarem ou aumentarem a atividade da lisozima sérica, a qual desestabiliza a parede celular bacteriana, podendo haver uma variabilidade destas ações decorrente da sensibilidade de cada grupo de bactéria (SILVA et al., 2015).

De acordo com o estudo de Barbosa et al., (2014) a tintura de própolis apresentou atividade antibacteriana contra o *Propionibacterium acnes*, ação está em concentração inibitória mínima de 0,625%. Por apresentar atividade cicatrizante tem-se na própolis um outro ponto a ser explorado para o tratamento da acne. Torna-se necessário a elaboração de formulações cosméticas menos agressivas que proporcionem a eficácia dos fármacos que são geralmente utilizados para acne.

CONCLUSÃO

Este trabalho fornecerá evidências *in vitro* de modo a fundamentar o manejo clínico e real eficácia terapêutica da própolis vermelha no tratamento da acne, o que auxilia no desenvolvimento de formulações cosméticas acessíveis com melhor adesão pelos pacientes. A utilização de produtos naturais com ação antimicrobiana é uma alternativa considerável frente ao uso de antibióticos sintéticos com maiores riscos de induzir resistência microbiana e ainda de desenvolver reações adversas, ainda nessa perspectiva o uso de outros fármacos como a isotretinoína representa uma terapia complicada, o que envolve todo o contexto de vida do paciente, necessitando de maiores cuidados. Portanto, é necessário a complementação dos resultados com os ensaios citados que estão em andamento.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, V. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e tintura de própolis frente à bactéria causadora da acne *Propionibacterium acnes*. **Rev. Bras. Pl. Med. Campinas**, v.16. n. 2. 2014.

BEYLOT, C. et al. *Propionibacterium acnes*: an update on its role in the pathogenesis of acne. **European Academy of Dermatology and Venereology**. 2013.

CARVALHO, R. S; BALTAZAR, F; AGUIAR, C. A. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard document M11-A8. 8. ed. Wayne, Pa, USA. CLSI, 2012.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Version 5.16b, Basel, SWZ, 2016. Disponível em: <http://mic.eucast.org/Eucast2/>.

GOMES, R. K; DAMAZIO, M. G. **Cosmetologia: Descomplicando os princípios ativos**. 3. ed. – São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2009.

JARDIM, D. M; OLIVEIRA, K. A. M; OLIVEIRA, G. V. Avaliação in Vitro da Atividade Antibacteriana de Diferentes Própolis. **Blucher Food Science Proceedings**. v. 1. n. 1. 2014.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

SILVA, A. C.C. et al. Sensibilidade de Agentes Bacterianos Patogênicos Frente à Ação Antibacteriana da Própolis. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. Pernambuco, v.5. n. 1. 2015.

SOUZA, A. J. F. Avaliação dos Efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina in vitro. 62f. Dissertação (Mestrado em biologia) **Departamento de Biologia. Universidade Estadual de Campinas**. São Paulo, 2009.

TORETI, V. C. et al. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2013.

ZAENGLEIN, A. L; THIBOUTOT, D. M. Acne Vulgar. In: BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; SCHAFFER, J. V. **Dermatologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.