

## CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO DE ESTAFILOCOCCOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

### CHEMICAL CHARACTERIZATION OF PROPOLIS ETHANOLIC EXTRACTS AND INIBITION ACTIVITY OF STAPHYLOCOCCUS OBTAINED FROM BOVINE MASTITIS

Erika Cristina Borges<sup>1</sup>; Luiz Cesar da Silva<sup>1</sup>; Severino Matias de Alencar<sup>2</sup>; Claudio Lima de Aguiar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Norte do Paraná – UNOPAR – Londrina – Brasil [luiz.silva@unopar.br](mailto:luiz.silva@unopar.br)

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP – Piracicaba – Brasil  
[claguiar@usp.br](mailto:claguiar@usp.br)

#### Resumo

*A mastite é uma doença multifatorial de grande importância para a pecuária e a indústria do leite, acarretando sérios prejuízos econômicos decorrentes da diminuição da secreção láctea ou da perda total desta capacidade. O trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis coletadas de região de Mata Atlântica da Bahia e Alagoas contra bactérias do gênero estafilococos isoladas de mastite bovina. Conclui-se que houve diferença na atividade inibitória contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. analisados neste estudo, sendo o maior potencial encontrado na amostra de própolis do tipo-6 contra uma cepa de *S. aureus* (Sa-2) com cerca de 75% da atividade inibitória do controle-positivo (gentamicina).*

**Palavras- chave:** Própolis, mastite, estafilococos, antimicrobiano, fenólicos.

#### 1. Introdução

As perdas na produção de leite atribuídas à mastite alcançam de 10 a 26% do total da produção, de acordo com grau de intensidade do processo inflamatório, da prevalência da doença, da patogenicidade do agente infeccioso e do estágio de lactação, sendo *Staphylococcus aureus* um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). Além da diminuição na produção leiteira, a mastite ocasiona perda na qualidade do leite, contribuindo para significativas perdas econômicas e é um problema de saúde pública (VIANNI e LÁZARO, 2003).

No intuito de solucionar ou minimizar os problemas causados pela ação de bactérias ao leite e seus derivados, diversas ações têm sido tomadas para inibir o crescimento de agentes microbianos que promovem a mastite bovina. A aplicação de antibiótico sintetizado por via química tem sido a prática usual de criadores de bovinos leiteiros, quando o animal é identificado. No entanto, normas de vigilância sanitária internacional têm criado barreiras sanitárias para a

comercialização de produtos de origem animal, quando este foi tratado com certos tipos de antibióticos (PINTO et al., 2001; REIS et al., 2003).

A própolis é uma resina coletada por abelhas do gênero *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exudados resinosos sendo transportados para dentro da colméia e, usualmente tem sido empregada pelas suas propriedades terapêuticas como antiinflamatória, antioxidante ou antimicrobiana (GHISALBERTI, 1979; PARK et al., 1998a). Suas propriedades biológicas têm sido associadas à sua composição química e, foi constatado que em amostras de própolis européias a composição química é bastante similar, visto que as abelhas do hemisfério norte são muito seletivas na coleta de resinas, principalmente da espécie *Populus alba* Salicaceae (PARK et al., 2002a). Entretanto, a composição química das própolis produzidas na América do Sul é de especial interesse, pois nessa região é menor a ocorrência de *Populus alba*, sendo observada diferença na composição de compostos fenólicos de própolis de algumas regiões brasileiras (SABATIER et al., 1992; PARK et al., 1997). Compostos químicos de própolis brasileira já foram isolados e identificados, tais como, flavonóides (flavonóis, flavonas e flavanonas), ácidos fenólicos e ésteres fenólicos e, suas concentrações variam dependendo da flora da região de coleta e a variabilidade genética da abelha (KOO e PARK, 1997; BANKOVA et al., 1992; BANKOVA et al., 1999). Diversos estudos levaram à classificação das própolis brasileira em doze grupos principais, de acordo com a composição química básica dos extratos alcoólicos obtidos daquelas própolis. Destes grupos, a própolis do tipo-6 apresentou elevada atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral (PINTO et al., 2001; ALENCAR, 2002), no entanto, um novo tipo de própolis da região de Mata Atlântica de Alagoas foi identificado e denominado de “própolis vermelha”.

Portanto, neste trabalho foi avaliada a sensibilidade de quatro isolados de mastite bovina (*Staphylococcus aureus* (dois isolados) e *Staphylococcus* sp. (dois isolados) frente aos extratos etanólicos de própolis (EEP) coletadas em duas regiões brasileiras (regiões de Mata Atlântica de Alagoas (própolis vermelha) e da Bahia (própolis tipo-6).

## 2. Material e Métodos

### *Própolis*

As amostras de própolis de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) foram coletadas por raspagem de melgueiras, nas regiões de Mata Atlântica da Bahia, nas proximidades do município de Entre Rios (11°56'31'' latitude Sul, 38°05'04'' longitude Oeste e altitude de 162 m) (própolis tipo-6) e de Mata Atlântica de Alagoas, no município de Maceió (09°39'57'' latitude Sul, 35°44'07'' longitude Oeste e altitude de 16 m) (própolis vermelha).

### *Extratos etanólicos de própolis-EEP*

Os EEP foram preparados a partir da adição de 15 mL de etanol (75%; Synth, São Paulo, Brasil) e 2 g de própolis triturada e homogeneizada. A extração foi feita a 70 °C por 30 min e agitação circular constante. Após isso, a amostra foi filtrada em papel de filtro Whatman n °1 (Maidstone, Inglaterra) e, o filtrado transferido para tubo de ensaio com tampa de rosca (15×160 mm). Ao resíduo foram adicionados 10 mL de etanol (75%), sendo feita mais uma extração alcoólica. Os sobrenadantes obtidos das duas extrações foram homogeneizados e acondicionados a 4 °C.

### *Absorbância por espectrofotometria na região ultravioleta dos EEP*

Os espectros na região de ultravioleta dos EEP foram obtidos por meio da adição de uma alíquota de 50 µL do EEP a 15 mL de solução a 75% de etanol (Merck, São Paulo, Brasil). Os espectros de absorção foram determinados na faixa de comprimento de onda de 190 a 362 nm, em espectrofotômetro Cintra 5 (GBC Scientific, Austrália).

### *Quantificação de fenólicos totais*

A determinação de fenólicos totais foi realizada de acordo com a técnica empregada por Nozella (2001). Em tubos de ensaio foram adicionados 50 µL do sobrenadante referente a cada diluição da amostra em água, 250 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (1 N) diluído 1:10 (v/v), 450 µL de água destilada e 1,25 mL de carbonato de sódio (20%, m/v). Os tubos foram agitados e após quarenta minutos foi feita a leitura em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 725 nm. O teor de fenólicos totais foi calculado em equivalente de ácido tânico, e expresso em µg de fenólicos, a partir da análise em triplicata (n=3).

### *Cromatografia em camada delgada de fase normal (CCD)*

A CCD dos EEP foi feita de acordo com Lozam-Junior et al. (2005), onde 5 µL do EEP foram aplicados em cromatoplasas de 0,2 mm de espessura Kiesegel G-60 F<sub>254</sub> (Merck Co., Alemanha). Utilizou-se como fase móvel uma mistura de tolueno (Synth, São Paulo, Brasil), clorofórmio (Merck, São Paulo, Brasil) e acetona (Synth, São Paulo, Brasil) na proporção de 40:25:35, respectivamente. As placas desenvolvidas foram observadas sob luz ultravioleta, no comprimento de 366 nm e, posteriormente, reveladas com solução 98% de anisaldeído (Rit-Chem Co. Inc., New York, Estados Unidos) em ácido sulfúrico P.A. (Merck, São Paulo, Brasil).

### *Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE)*

Foi realizada segundo método proposto por Park et al.(2002b), onde alíquotas de 3 µL dos EEP foram aplicados em cromatoplasas (10×10 cm) RP-18 F<sub>254</sub>S (Merck Co., Alemanha). O tempo

de desenvolvimento do cromatograma foi de 100 minutos aproximadamente, utilizando como fase móvel uma mistura etanol:água (55:45, v/v). As placas desenvolvidas foram observadas sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 e 366 nm, utilizando iluminador U. V. Cole Parmer, modelo UVP-UVGL 58.

#### *Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)*

As análises dos EEP por CLAE-FR foram feitas de acordo com o método proposto por Park et al. (2002b). Amostras de EEP (20 µL) foram injetadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e coluna YMC Pack ODS-A (250 × 4,6 mm). A fase móvel foi composta de água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com fluxo constante de 1,0 mL/min e a leitura foi feita a 254 nm. O gradiente iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 min, 50% de B em 30 min, 60% de B em 45 min, 75% de B em 65 min, 75% de B em 85 min, 90% de B em 95 min e, 30% de B em 105 min. A coluna foi mantida à 35°C e os cromatogramas foram processados em software específico. Os compostos eluídos foram analisados pelos espectros de absorção na região UV (200-400 nm), utilizando os recursos do detector SPD-M10A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão) e co-cromatografia contra padrões autênticos de ácido *p*-coumárico, ácido ferrúlico, ácido cinâmico, ácido gálico, quercetina, kaempferol, kaempferide, apigenina, isoramnetina, ramnetina, sakuranetina, isosakuranetina, hesperidina, hesperetina, pinocebrina, crisina, acacetina, galangina e miricetina (Extrasynthese, Genay, França).

#### *Atividade antimicrobiana*

Os microrganismos utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana dos EEP foram isolados de animais com mastite subclínica. O meio de cultura utilizado para crescimento bacteriano foi ágar-nutriente DIFCO 0001 (Becton, Dickinson and Co., Franklin, Estados Unidos). O crescimento microbiano foi realizado em tubos de ensaio contendo 10 mL de ágar-nutriente inclinado e incubados a 37 °C por 18 h. Para o teste da atividade antimicrobiana foram utilizados discos de papel de filtro Whatman nº3 (φ 5 mm) aos quais foram aplicados 20 µL dos EEP, sendo colocados em dessecador à temperatura ambiente por 24 h. Posteriormente, foram mantidos em estufa a 60 °C por 2 h para eliminação completa da solução de etanol dos EEP analisados. Culturas bacterianas ativas foram inoculadas por espalhamento com “swab” em placas de Petri contendo ágar-nutriente mais 2% de ágar e, os discos contendo as amostras foram colocados sobre as placas inoculadas e incubadas a 37 °C por 18 horas. Os resultados foram expressos como milímetros do halo de inibição do crescimento microbiano. Discos de gentamicina (10 µg) foram empregados como controle-positivo da atividade inibitória do crescimento bacteriano.

### 3. Resultados e Discussão

Alguns estudos preliminares têm mostrado uma característica química peculiar de amostras de própolis coletadas na região de Mata Atlântica de Alagoas (própolis vermelha). Foram feitos alguns testes preliminares e constatou-se que suas características física e química diferem das outras amostras de própolis brasileira até então classificadas por Park et al. (2000) (Grupos 1-12). Maiores estudos têm sido feitos com esta própolis quanto às suas atividades biológicas por Porfírio et al. (2005a; 2005b), Alencar (2002) e Aguiar et al. (2003).

Tem sido observado que há grande variação na coloração dos EEP preparados com amostras de própolis coletadas em diferentes localidades do litoral de Alagoas. Verificou-se que em todas as amostras há predominância pela coloração vermelha nos EEP preparados; sendo na sua maioria de coloração vinho, seguido de vermelho e vermelho claro. Não somente a coloração do EEP deste tipo de própolis tem se diferenciado dos demais tipos de própolis até então classificadas, mas também o perfil em CCDAE tem sido característico para a própolis vermelha coletada no litoral alagoano. Na Figura 1, são apresentados os perfis de compostos químicos por CCDAE de amostras de própolis vermelha.

As amostras de própolis vermelha apresentaram um perfil de CCDAE característico e diferenciado dos perfis de outras amostras de própolis coletadas no território nacional (Figura 1), como tem sido descrito por Aguiar et al. (2003).



Figura 1 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência de amostras de própolis vermelha de Mata Atlântica do estado de Alagoas.

No entanto, os espectros de varredura na região UV destas amostras de própolis (Figura 2) apresentaram valores de absorção máxima de aproximadamente 280 nm, com valores de absorção máxima variando de 280 a 282 nm, o que demonstra uma similaridade na característica dos compostos químicos presentes por absorver próximos à região de flavonóides e ácidos fenólicos, tais como outros tipos de própolis.

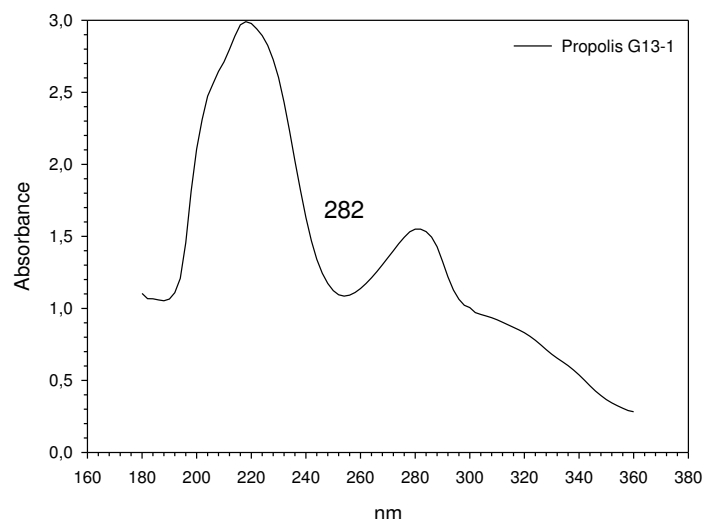


Figura 2 - Espectro absorção na região ultravioleta (182-380 nm) de extrato etanólico de própolis vermelha coletada no estado de Alagoas.

Neste trabalho, amostras de própolis foram analisadas, sendo estas coletadas de regiões de Mata Atlântica de Alagoas (própolis vermelha) e da Bahia (tipo-6). As amostras de própolis da Bahia foram coletadas no município de Entre Rios, 11°56'31'' latitude Sul, 38°05'04'' longitude Oeste e com altitude de 162 m. A vegetação predominante de mangue é encontrada no município baiano, no entanto, Park et al. (2002a; 2002b) têm mostrado que a origem botânica da própolis coletada por abelhas do gênero *Apis mellifera* nesta região brasileira, foi *Hyptis divaricata* (Lamiaceae; CRIA, 2006). Da mesma forma, as amostras de própolis de Alagoas foram coletadas numa região de mangue, 09°39'57'' latitude Sul, 35°44'07'' longitude Oeste e com altitude de 16 m, com clima temperado e temperaturas máximas e mínimas de 29 e 24°C, respectivamente.

Os espectros de varredura na região ultravioleta destas amostras de própolis podem ser visto nas Figura 2 (própolis vermelha) e Figura 3 (própolis do tipo-6), com os valores de absorção máxima na região ultravioleta. As amostras apresentaram da mesma forma valores de absorção máxima ao redor de 280 nm, após varredura do espectro de absorção entre 180 e 382 nm. As amostras de própolis do tipo-6 apresentaram perfis similares perfil em CCD (Figura 4), característico às amostras de própolis do tipo-6, segundo classificação de Park et al. (2000). A amostra de própolis coletada no estado de Alagoas apresentou perfil similar às de outras amostras de própolis, com absorção máxima ao redor de 280 nm, região característica de compostos fenólicos.

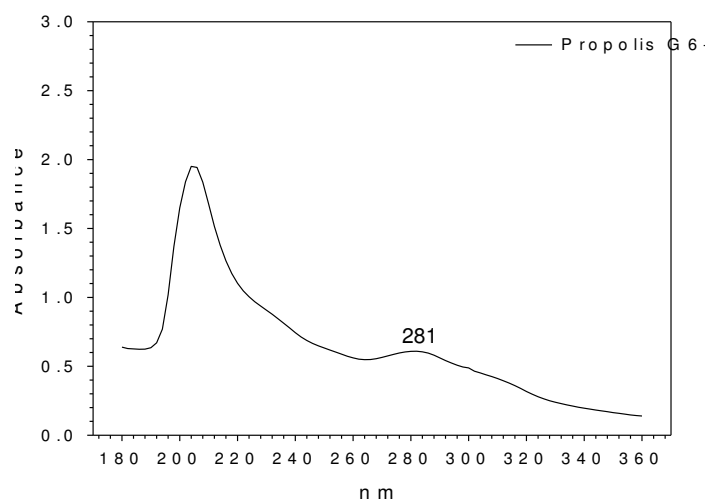


Figura 3 - Espectro de absorção máxima dos EEP preparados com amostras de própolis coletadas na região de Mata Atlântica da Bahia.

Conforme observado na Figura 4, diferentes bandas foram resolvidas das amostras de EEP. As bandas obtidas na eluição cromatográfica e, reveladas pela solução de anisaldeído-sulfúrico, apresentaram diferentes colorações conforme as reações específicas com o composto ou grupo de compostos separados, como demonstrado por White e Howard (1967).



Figura 4 - Cromatografia em camada delgada de amostras de própolis de Mata Atlântica de Alagoas (A) e da Bahia (B) reveladas com solução de anisaldeído-sulfúrico.

Na análise em cromatoplas de sílica-gel 60 F<sub>254</sub>, em todas as amostras, alguns compostos apresentaram similaridade de Rf's e colorações (do azul ao verde, e algumas bandas vermelhas ou violetas) após revelação com solução de anisaldeído-sulfúrico (Tabela 1).

Tabela 1 - Relações de frente (Rf) e cores desenvolvidas para os compostos separados em CCD das amostras de extratos etanólicos de própolis vermelha e do tipo-6.

Bandas	Reveladores			
	Anisaldeído-Sulfúrico		UV (254 nm)	
	Própolis Tipo-6	Própolis Vermelha	Própolis Tipo-6	Própolis Vermelha
Banda #1	0,54 Verde	0,54 Vermelho	n.d.	n.d.
Banda #2	0,59 Verde	n.d.	n.d.	n.d.
Banda #3	0,67 Violeta	0,70 Vermelho	n.d.	n.d.
Banda #4	0,74 Verde	0,74 Vermelho	n.d.	n.d.
Banda #5	0,88 Verde	0,89 Vermelho	n.d.	n.d.
Banda #6	0,93 Violeta	0,93 Violeta	n.d.	n.d.
Banda #7	0,98 Verde	0,98 Azul	n.d.	n.d.

n.d., não detectado.

Foi observado que os perfis em CCD revelados por solução de anisaldeído-sulfúrico apresentaram acentuada similaridade com relação aos valores de Rf, mostrando certa correlação entre os compostos químicos presentes nas amostras independentemente da região de onde foram coletadas as amostras de própolis analisadas neste trabalho.

As concentrações de compostos fenólicos totais (expressos em µg de ácido tânico) presentes nestas amostras de EEP foram determinadas e podem ser observadas na Tabela 2. As amostras de própolis vermelha de Alagoas (n=3) apresentaram concentrações sensivelmente superiores aos valores obtidos nas amostras da Bahia, bem como o teor de sólidos insolúveis na amostra alagoana foi inferior aos teores obtidos nas outras amostras. As amostras de própolis vermelha apresentaram ainda uma concentração de fenólicos totais 2,97 vezes maior que a amostra de própolis do tipo-6.

Tabela 2 - Sólidos insolúveis e fenólicos totais dos extratos etanólicos de própolis (n=3)<sup>a</sup>.

EEP	Localidade da coleta	Sólidos insolúveis <sup>b</sup>	Fenólicos totais <sup>c</sup>
Própolis tipo-6 (2)	Entre Rios/BA	66,0±2,1	7,9±0,2
Própolis vermelha	Maceió/AL	38,0±1,5	23,5±1,2

<sup>a</sup>Valores médios obtidos da análise em triplicata ± desvio padrão. <sup>b</sup>Sólidos insolúveis determinados pela diferença de massa do resíduo filtrado úmido e após secagem até massa constante. <sup>c</sup>Fenólicos totais determinados por método colorimétrico de Folin-Ciocalteu contra curva-padrão de ácido tânico, e expresso em µg de fenóis.

Em amostras de própolis do tipo-6 a presença de compostos fenólicos, como flavonóides, têm sido pouco frequente, senão totalmente ausente (CASTRO et al., 2009; CASTRO et al., 2007).

Ribeiro et al. (2005) analisaram amostras de própolis do tipo-6 e não encontraram nenhum flavonóide e, em ensaios preliminares as amostras demonstraram possuir grande quantidade de ácidos graxos de alto peso molecular com alta atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*.



Os principais ácidos graxos encontrados por cromatografia gasosa foram ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido linoléico (18:2), ácido linolênico (18:3), ácido araquídico (20:0) e ácido behêmico (22:0). Neste trabalho, em análises por CLAE-FR, não foram encontrados quaisquer ácidos fenólicos ou flavonóides nas amostras de própolis do tipo-6, corroborando com as observações de Ribeiro et al. (2005). Os resultados são apresentados na Figura 5. Estes resultados corroboram com as análises de teor de fenólicos totais, as quais apresentaram menores teores de fenólicos para as amostras de própolis coletadas na Mata Atlântica baiana comparadas às amostras de própolis vermelha. Os fenólicos totais das amostras de própolis baiana, em média, representaram 24,8% do teor de fenóis totais encontrado nas amostras de própolis vermelha (Tabela 2).

Os perfis cromatográficos em CLAE-FR das amostras de própolis estudadas demonstraram complexidade na composição química, no entanto, quaisquer compostos químicos foram relacionados com os ácidos fenólicos e flavonóides utilizados como padrões autênticos neste trabalho (Figura 5).

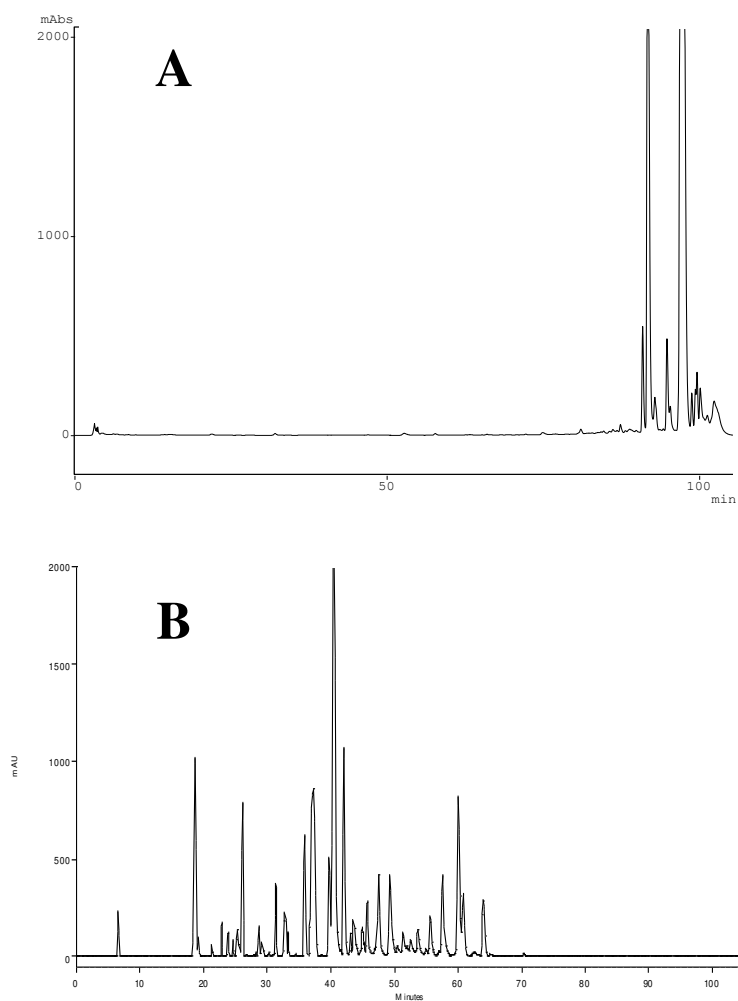


Figura 5 - Perfis em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa dos EEP da amostra de própolis tipo-6 (A) e da própolis vermelha (B).

A partir da eluição cromatográfica das amostras de própolis da Bahia pôde-se verificar uma forte característica polar dos compostos químicos presentes naquelas amostras, visto o perfil dos compostos no final do cromatograma quando o sistema gradiente se apresenta mais polar que no início da corrida cromatográfica.

Estudos prévios sobre a atividade antimicrobiana das amostras de própolis vermelha de Alagoas foram efetuados e os resultados mostraram considerável atividade inibitória do crescimento de uma cepa de *Staphylococcus aureus*. Praticamente, todas as amostras apresentaram alguma inibição do crescimento de *S. aureus*, no entanto, há variação na capacidade inibitória, sendo que algumas amostras de própolis vermelha apresentaram maiores halos de inibição (2 mm) da bactéria durante ensaios de antibiograma.

Segundo Pardo et al. (1999), o gênero estafilococos é considerado a maior incidência entre os agentes etiológicos da mastite bovina, sendo que dentre 177 microrganismos (bactérias, fungos ou algas unicelulares), em cultura pura e em associação, a presença mais freqüente foi do gênero *Staphylococcus* sp. (54%) seguido do gênero *Streptococcus* sp. (22%). Neste trabalho foram feitas análises da atividade inibitória do crescimento de quatro cepas isoladas no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Norte do Paraná de vacas leiteiras com diagnóstico de mastite subclínica. Nos testes de inibição foram utilizados os EEP preparados com amostras de própolis coletadas em regiões de Mata Atlântica dos estados de Alagoas e da Bahia. Foram feitos estudos com uma amostra de própolis vermelha e do tipo-6 contra as bactérias isoladas de mastite bovina subclínica.

O teor de fenólicos totais parece não influir diretamente na inibição das bactérias isoladas de mastite bovina, no entanto, pode-se verificar que todas as amostras de própolis apresentaram alguma capacidade de inibir o crescimento bacteriano, com exceção à amostra de própolis vermelha que não foi capaz de inibir o crescimento de um dos isolados de *Staphylococcus* sp. (indicado como “Sta-2”). A amostra de própolis do tipo-6 foi capaz de inibir todas as bactérias testadas neste trabalho, sendo o valor de inibição (em mm) para o isolado da bactéria “Sa-2” o maior (12 mm) (Tabela 3). O isolado de *Staphylococcus* sp. (“Sta-2”) foi a menos susceptível à ação inibitória das amostras de própolis analisadas e, estudos complementares estão sendo executados para verificar a causa desta aparente resistência deste isolado bacteriano. A inibição observada durante os testes foi uma inibição parcial do crescimento bacteriano, o qual permite uma inibição inicial do crescimento microbiano, no entanto, sem a capacidade de inibir totalmente a bactéria, a qual após um período de tempo é capaz de se multiplicar no meio de cultura testado. Logo, os valores analisados neste trabalho foram considerados como inibição parcial do crescimento. Muitos fatores podem estar associados à incapacidade de inibição total das bactérias pelas amostras analisadas, e estes fatores serão analisados num projeto continuado.

Tabela 3 - Valores de inibição do crescimento de *Staphylococcus* sp. (Sta-1 e Sta-2) e *Staphylococcus aureus* (Sa-1 e Sa-2) pelos extratos etanólicos de própolis<sup>a</sup>.

Amostra	Valores de halo de inibição (mm)			
	Sta-1	Sta-2	Sa-1	Sa-2
G6-2	8,0±0,1	8,0±0,1	8,0±0,1	12,0±0,2
G13-1	10,0±0,3	n.d. <sup>b</sup>	6,0±0,2	6,0±0,1
Gentamicina <sup>c</sup>	14,0±0,3	17,0±0,2	15,0±0,2	16,0±0,1

<sup>a</sup>Valores médios (média ± desvio padrão) obtidos de análises independentes da atividade inibitória de amostras de própolis de Alagoas e da Bahia (n=3) e, expressos em milímetro de halo de inibição. <sup>b</sup>n.d.: Inibição não foi detectada. <sup>c</sup>Discos contendo 10 µg de gentamicina foram empregados como controle-positivo da atividade inibitória.

As análises por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região ultravioleta demonstraram similaridade nos perfis de composição química das amostras de própolis das duas regiões estudadas (Mata Atlântica baiana e alagoana). No entanto, houve diferença na atividade inibitória contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. analisados, sendo que o maior potencial encontrado foi para a amostra de própolis do tipo-6 contra um isolado de *Staphylococcus aureus* que apresentou halo de inibição de 12 mm, o qual representa 75% da atividade inibitória do crescimento bacteriano comparado aos discos de gentamicina a 10 µg.

#### 4. Conclusão

A partir dos dados obtidos no presente trabalho, pôde-se concluir que as amostras de própolis vermelha e do tipo-6 apresentaram alguma similaridade nos perfis de composição química por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria na região UV-visível, muito embora a análise em CLAE-FR tenha demonstrado diferença nos perfis cromatográficos. As amostras também apresentaram diferenças na atividade inibitória contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. analisados, sendo que o maior potencial encontrado foi para a própolis tipo-6 contra um isolado de *Staphylococcus aureus* com cerca de 75% da atividade inibitória do controle-positivo (gentamicina).

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à colaboração de Rúbia S. S. Barbalho do Programa de Apicultura/Sebrae-AL pela doação das amostras de própolis vermelha.

#### Abstract

*Mastitis is a multifactorial disease with great importance in dairy industry, causing serious economic problems by the reduction or total loss of the capacity of milk secretion. The present work had as objective to evaluate the antimicrobial activity of ethanolic extracts of propolis collected in the Brazilian Atlantic Forest in Bahia and Alagoas States against staphylococcus isolated from bovine mastitis. We were concluded that some difference in the inhibitory activity against*

*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* analyzed in this work, and the major potential was found to propolis type-6 against a strain of *S. aureus* with 75,0% of the inhibitory activity of the control with 10- $\mu$ g of gentamicin.

**Key-words:** Propolis, mastitis, staphylococcus, antimicrobial, phenolic compounds.

## Referências

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; KOO, M. H.; PARK, Y. K. Caracterização físico-química das própolis originárias da região de Mata Atlântica do Estado de Alagoas. **Mensagem Doce**, v. 72, p. 15-21, 2003.

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de Apis mellifera africanizada de diferentes regiões do Brasil**. Campinas, 2002. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, J. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 607, p. 150-153, 1992. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)87067-I](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(92)87067-I)

BANKOVA, V.; KRASTEVA, G.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV. A.; RODELLA, R.; POPOV, S. Photochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 54, p. 401-405, 1999.

CASTRO, M. L.; NASCIMENTO, A. M.; IKEGAKI, M.; COSTA-NETO, C. M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 5332–5335, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.04.066>

CASTRO, M. L.; CURY, A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000700003>

CRIA 2006. **Centro de Referência em Informação Ambiental**. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/opus>, acessada em maio de 2006.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1315-1320, 2004. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000400058>

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 367-369, 1997. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.61.367>

LOZAM-JUNIOR, R.; TERRILE, A. E.; AGUIAR, C. L. Atividade antimicrobiana da fumaça líquida obtida de *Bambusa* sp. contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. isolados de mastite bovina. **Revista Unopar Científica**, v. 7, p. 5-12, 2005.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. Piracicaba, 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Energia Nuclear na Agricultura) – Universidade de São Paulo.

PARDO, R. B.; STURION, D. J.; BASILE, J. R.; CHAVES-NETO, A. F.; DUARTE, D. D. S.; FERNANDES, A. A.; YOKOSAWA, S. Y.; MENCK, R. C.; GODOY, C. A.; FARINAZZO, A. M.; PANÍCIO, E. M. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas (PR). **Revista Unopar Científica**, v. 1, p. 25-30, 1999.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, p. 997-1003, 2002a. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000600013>

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin of Brazilian propolis and their chemical compositions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002b. <http://dx.doi.org/10.1021/jf011432b>

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, p. 2-7, 2000.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Investigations of the flavonoid aglycones of propolis collected by *Apis mellifera* in Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, p. 97-106, 1997.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 143-148, 1998.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 278-283, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962001000600006>

PORFÍRIO, Z.; BISPO-JUNIOR, W.; BISPO, J. R.; ARAÚJO, Y. A. Atividade antimicrobiana de extrato de própolis vermelha de Alagoas. p 152, In Proceeding Book, **Encontro Internacional de Ciências Farmacêuticas**, Recife, Brasil. 2005a.

PORFÍRIO, Z.; BISPO-JUNIOR, W.; BISPO, J.R.; OLIVEIRA, I.R. Prospecção química e atividade cicatricial de feridas contaminadas de extrato de própolis vermelha de Alagoas. p 153, In Proceeding Book, **Encontro Internacional de Ciências Farmacêuticas**, Recife, Brasil. 2005b.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 651-658, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352003000600001>

RIBEIRO, W. C.; DIAS, C. B.; MORENO, I. A. M.; CARDOSO, J.; ALENCAR, S. M. *Estudo da composição química de ácidos graxos bioativos de própolis de Apis mellifera do tipo 6*. In: **Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos**, 5., Campinas, 2005.

SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 773-777, 1992. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb08094.x>

VIANNI, M. C. E.; LÁZARO, N. S. Profile of antimicrobial susceptibility in strains of Gram positive cocos, negative catalase, isolated from buffalo subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p. 47-51, 2003.

WHITE, R. H.; HOWARD, J. W. Thin-layer chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chromatography A**, v. 29, p. 108-114, 1967. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92634-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92634-7)

---

Submetido em 09 mai. 2013, Aceito para publicação em 15 jul. 2013.