

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Ary Fernandes Júnior

Produtos antimicrobianos naturais: Potencial de uso na terapêutica das doenças infecciosas e como aditivos em alimentos

Texto sistematizado de linha de pesquisa apresentado ao Instituto de Biotecnologia de Botucatu como parte das exigências para obtenção do título de Professor Livre-Docente em Microbiologia Médica.

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSIMEIRE APARECIDA VICENTE**

Fernandes Junior, Ary.

Produtos antimicrobianos naturais: potencial de uso na terapêutica das doenças infecciosas e como aditivos em alimentos / Ary Fernandes Junior. - Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (livre-docência) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Capes: 21202010

1. Plantas medicinais. 2. Produtos naturais. 3. Própolis - Uso terapêutico. 4. Essências e óleos essenciais - Uso terapêutico. 5. Doenças transmissíveis.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Extratos de plantas; Óleos essenciais; Plantas medicinais; Produtos naturais; Própolis.

Sumário

Página

RESUMO

1) CONSIDERAÇÕES INICIAIS	01
2) PRÓPOLIS E AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS SEUS PRODUTOS DERIVADOS	03
2.1. Comentários gerais sobre abelhas	03
2.2. Aspectos gerais sobre a própolis	04
2.3. Propriedade antimicrobiana da própolis	10
2.4. Aspectos gerais sobre o mel.....	27
3) ANEXOS DAS PUBLICAÇÕES SOBRE AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS.....	30
Anexo 1	31
Anexo 2	39
Anexo 3.....	47
Anexo 4.....	56
Anexo 5.....	61
Anexo 6.....	71
Anexo 7.....	81
4) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ESTUDOS COM PRÓPOLIS.....	90
5) PLANTAS MEDICINAIS E AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS SEUS PRODUTOS DERIVADOS	102
5.1. Aspectos gerais sobre plantas medicinais	102
5.2. Aspectos gerais sobre os antimicrobianos vegetais.....	106
5.3. Óleos essenciais como aditivo em alimentos	131

6) ANEXOS DAS PUBLICAÇÕES SOBRE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PLANTAS.....	141
Anexo 1	142
Anexo 2	147
Anexo 3	151
Anexo 4	156
Anexo 5	163
Anexo 6	176
Anexo 7	181
7) CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	187
8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS.....	189

Lista de Figuras

Página

Seção referente a própolis

- Figura 1. Fotos ilustrativas dos passos para elaboração da própolis de *Apis mellifera* até momento prévio ao preparo do derivado da própolis. <http://espaber.uspnet.usp.br/espaber/wp-content/uploads/2011/09/raw-própolis-with-mortar.jpg>. (Disponível em 04/04/2012)06
- Figura 2. Aspecto geral dos ensaios pela metodologia da diluição em agar. (A) Preparo dos inóculos padronizados, (B e C) Uso do carimbador de Sterr e (D) Placas com crescimento bacteriano após 37° C/24 horas. (Fonte- ARY FERNANDES JÚNIOR)12
- Figura 3. Fotos ilustrativas de espécies de Meliponíneos (Abelhas sem Ferrão). A-Uruçú (*Melipona scutellaris*), B-Tiúba (*Melipona cupressipes*), C-Jataí (*Tetragonisca angustula*). Fonte- <http://www.meliponariodosertao.blogspot.com.br/> (Disponível em 04/04/2012)17
- Figura 4. Aspecto geral dos ensaios realizados para verificação de sinergismo entre drogas antimicrobianas e própolis utilizando metodologia dos (A) discos e (B) E-. test (Fonte- ARY FERNANDES JÚNIOR)24

Seção referente as plantas medicinais

- Figura 1. Ilustração dos principais fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas (Fonte-GOBBO NETTO & LOPES, 2007) 104
- Figura 2. Fotos ilustrativas de ensaios de sensibilidade bacteriana pela a (A) macrodiluição realizada para quatro extratos de plantas em placas de 24 poços que substituíram os tubos de vidro; e (B) microdiluição em placas de 96 poços para um total de 8 cepas bacterianas distintas frente a um óleo essencial. A cor observada deve-se ao acréscimo de resazurina para revelar crescimento bacteriano após 24horas/37°C. (ARY FERNANDES JÚNIOR) 110

Figura 3. Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana (Fonte-BURT, 2004)	113
Figura 4. Metabólitos secundários de plantas com capacidade de influenciar nos mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos. (A*) Corilagina, tellimagrandina I, diterpeno 416 e composto P inibem PBP2a; (B*) EGCg (Epigallocatequina) inibe a β -lactamase; (C*) timol, carvacrol, ácido gálico reduzem a permeabilidade da membrana externa, e (D*) EGCg, 5'-methoxyhydnocarpina, reserpina, ácido carnósico e derivados isopimarano inibem a bombas de efluxo (Fonte- Adaptado de HEMAISWARYA et al., 2008)	116
Figura 5. Elaboração dos extratos hidro-alcólicos de plantas (A) <i>Davilla elíptica</i> , (B e C) obtenção do filtrado contendo solvente metanol, (C) Evaporador rotativo do Departamento de Microbiologia e Imunologia /IBB/UNESP/Botucatu utilizado na remoção do solvente e obtenção do extrato (Fonte-ARY FERNANDES JÚNIOR)	122
Figura 6. Preparo de óleo essencial de plantas (A) <i>Vernonia polyanthes</i> , (B) <i>Baccharis dracunculifolia</i> , (C) Aparelho de destilação dos óleos essenciais por arraste de vapor tipo Clevenger da marca Marconi, modelo MA480, do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IBB/UNESP/Botucatu, (D) Detalhe do óleo essencial no frasco tipo Fiorentino. (Fonte – ARY FERNANDES JÚNIOR)	124
Figura 7. Ilustração de um ensaio de curva de sobrevivência para uma cepa padrão ATCC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> em água adicionada individualmente com cinco óleos essenciais diferentes (Fonte-MACHADO (2011)).....	128
Figura 8. Cromatograma da combinação entre os óleos essenciais de <i>C. aromaticus</i> e <i>C. zeylanicum</i> obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Os números referem-se aos picos respectivos e identificação do composto mais o seu percentual. 3- α -pineno (0,16), 5- eucaliptol (0,49), 11, 12, 13- cinamaldeído (38,22), 17- eugenol (39,44), 21- β -cariofileno (1,30), 22- acetato de cinamila (3,96), 28- acetato de eugenila (7,80). (Fonte-PROBST, 2012)	130

Figura 9. Valores médios atribuídos por avaliadores durante os testes de aceitação global das amostras de hambúrguer grelhado. Alinha referente ao valor cinco refere-se ao índice não gostei e nem desgostei (Fonte. BARBOSA, 2010)	136
Figura 10. Imagens das alterações por microscopia eletrônica de transmissão verificadas em células de <i>Lactobacillus. rhamnosus</i> provocada por ação de concentrações distintas de óleo essencial de canela (FENIMAN, 2011; FENIMAN et al., 2012 -disponível on line)	139

Lista de Tabelas

Tabela 1. Interações entre extratos de plantas medicinais e drogas antimicrobianas para linhagens de <i>E. coli</i> isoladas de casos clínicos humanos.....	120
---	-----

RESUMO. Desde os primórdios da civilização a busca pela cura dos males que afligem a humanidade é uma constante. Considerando as inúmeras doenças que podem acometer os seres humanos, as causadas por micro-organismos merecem um destaque especial. Embora a antibioticoterapia tenha revolucionado a medicina quanto ao tratamento das doenças infecciosas, a ponto de acreditarmos que este tipo de doença não seria mais um problema doravante, a verdade, porém nos foi apresentada de forma bastante angustiante. Poucos anos depois do início do uso da penicilina, por exemplo, já existiam relatos sobre as primeiras ocorrências de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a esta droga. Obviamente a idéia de que nossos problemas com as doenças infecciosas estavam resolvidos foi decorrente de uma visão ingênua, pois nos esquecemos por um momento que a interação entre micro-organismos e drogas antimicrobianas era uma clássica condição de pressão seletiva que culminou com a seleção de linhagens resistentes a este grupo de substâncias. Este fenômeno levou os pesquisadores, e a indústria de medicamentos, a buscarem de forma incisiva novas drogas antimicrobianas para introduzi-las ao arsenal já existente. A título de informação, o desenvolvimento de drogas semi-sintéticas por muito tempo tem sido a forma usual para contornar o problema da resistência antimicrobiana, pois entre os anos de 1960 e 2000 nenhum grupo de drogas antimicrobianas foi apresentado com alternativa para o tratamento das doenças infecciosas. Considerando os comentários feitos, acreditamos que a natureza, como já foi em momentos anteriores, será novamente a fonte de compostos antimicrobianos uma vez que o fenômeno da antibiose – produção e liberação de substâncias por seres vivos com capacidade de inibir o desenvolvimento de outros seres – rege os princípios da antibioticoterapia. Desta forma, o objetivo deste texto é reportar dados de literatura, bem como os vários trabalhos realizados sob nossa responsabilidade, quanto ao potencial de uso de derivados antimicrobianos obtidos tanto a partir de própolis - produto resinoso elaborado pelas abelhas e que apresenta inúmeras funções na colméia – como também daqueles originados durante o metabolismo secundário das plantas ditas medicinais. Nossas pesquisas foram direcionadas para o aspecto antimicrobiano destes produtos, seja objetivando esclarecer o seu potencial para o tratamento das doenças infecciosas como também na forma de aditivo em alimentos.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, produtos naturais, própolis, plantas medicinais, óleos essenciais, extratos de plantas

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Embora eu tenha obtido os títulos de mestre e doutor em agronomia, com ênfase na área de tratamento de resíduos agroindustriais por biodigestão anaeróbia, foi na área de produtos naturais com propriedades antimicrobianas que consolidei a minha linha de pesquisa, com início no ano de 1993 por ocasião de minha contratação no Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/UNESP. Idealizei esta linha de pesquisa segundo uma visão bastante ampla e com objetivo claro de realizar uma prospecção de produtos antimicrobianos naturais com finalidade de contribuir com a terapêutica das doenças infecciosas, quem sabe num futuro na forma de um produto comercial.

Todos os trabalhos na área de produtos naturais publicados, e mencionados neste material, referem-se as minhas orientações tanto de iniciação científica, especialmente para elaboração de trabalho de conclusão de curso (TCC), como também de alunos de pós-graduação. No caso da pós graduação, ingressei em meu primeiro programa (Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP) no ano de 2008, e até o presente foram finalizadas quatro orientações de Mestrado, todas elas com produtos naturais, sendo dois Biomédicos, um Nutricionista e um profissional em Naturologia Aplicada. Além destas, orientei um doutoramento, neste caso uma profissional em Tecnologia de Alimentos. Atualmente estou orientando dois doutorados, um mestrado e duas iniciações científicas, sendo todas estas orientações com projetos também na área de produtos naturais.

Inicialmente realizei os estudos com produtos antimicrobianos preparados com a própolis de abelha da espécie *Apis mellifera* e também com abelhas nativas do grupo dos Meliponíneos, também conhecidas com abelhas sem ferrão. Em seguida, realizamos estudos utilizando derivados antimicrobianos de plantas, com destaque para aquelas utilizadas na medicina popular objetivando o tratamento das doenças infecciosas. Assim sendo, será dado ênfase neste material aos aspectos da propriedade antimicrobiana destes produtos e o sinergismo com drogas antimicrobianas de uso convencional. Saliento também que já realizamos em nosso laboratório pesquisas com finalidade de testar o uso potencial destes produtos,

especialmente os óleos essenciais, como aditivos em alimentos com finalidades antimicrobianas ou mesmo flavorizantes.

Gostaria de destacar que outros projetos que também resultaram em publicações não serão mencionados aqui, embora alguns destes também tenham como objeto central os produtos naturais, especialmente aqueles relacionados às áreas específicas de Microbiologia de Alimentos, Bioquímica e Imunologia. Todas estas publicações estão devidamente apresentadas no memorial.

O texto a seguir foi redigido de acordo com o disposto no artigo 6º da Resolução UNESP número 27 de 14 de abril de 2009, o qual, dentre as provas realizadas para obtenção do título de Livre-Docente, inclui a defesa de uma tese ou texto que sistematize criticamente a obra do candidato ou parte dela, resumizando de forma integrada os trabalhos desenvolvidos pelo candidato dentro de uma linha de pesquisa, evidenciando a originalidade de sua contribuição nos campos da ciência. Desta forma, o texto é apresentado em duas partes específicas, sendo que na primeira parte abordarei os aspectos antimicrobianos relacionados aos estudos realizados com a própolis, especialmente a de *Apis mellifera*, e na sequência aqueles realizados com antimicrobianos vegetais, especialmente os derivados de plantas medicinais.

2. PRÓPOLIS E AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS SEUS PRODUTOS DERIVADOS

2.1. Comentários gerais sobre as abelhas

Deste a antiguidade as abelhas são valorizadas pelos seus produtos e admiradas pelo seu comportamento. Elas já foram desenhadas em quadros e pinturas em cavernas, descritas em manuscritos, livros científicos, líricos, cunhas em medalhas, bijuterias, moedas e objetos de barro. Supõe-se que os egípcios foram os pioneiros na apicultura - arte de criar abelhas - tendo o mel sido considerado um medicamento popular com participação em um número expressivo de remédios utilizados naquela época (COUTO & COUTO, 1996).

Acredita-se que as abelhas surgiram no planeta Terra já com uma íntima relação com as plantas Angiospermas. Inicialmente esses insetos coletavam néctar de flores e predavam pequenos animais como fonte protéica. Contudo, em um determinado momento da evolução, trocaram a proteína animal por vegetal, passando a consumir pólen que elas também recolhiam das plantas visitadas (CARVALHO & MARCHINI, 1999).

As abelhas sociais mais utilizadas comercialmente pertencem ao gênero *Apis* (Hymenoptera, Apidae), sendo classificadas em 7 espécies diferentes: *Apis florea*, *A. andreniformes*, *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. mellifera*, *A. laboriosa* e *A. koschevnikovi*. Segundo Wiese (2005), a *A. mellifera* L foi introduzida no Brasil no ano de 1839 oriundas de Portugal. Porém, com a chegada dos imigrantes europeus, no ano de 1845, houve a introdução de uma raça alemã denominada *A. mellifera mellifera*, conhecida como abelha alemã ou preta. Entre 1870 e 1880, houve outra nova entrada de abelha no país de raça italiana denominada *A. mellifera ligustica* e, finalmente em 1956, houve introdução da raça africana denominada *A. mellifera scutellata*. A consequência destas introduções, e repetidos cruzamentos, é que há no Brasil atualmente uma abelha da espécie *A. mellifera* com características morfológicas e comportamentais próximas das africanizadas.

Outro grupo de abelhas que ultimamente vem recebendo atenção de pesquisadores é o das abelhas-sem-ferrão da tribo Melliponinae (Meliponíneos), que habitam as regiões tropicais, sendo que na América Latina existem aproximadamente 300 espécies e a maioria é produtora de méis de grande

aceitação principalmente nas próprias regiões produtoras. Estas abelhas são excelentes agentes polinizadores e muitas vezes utilizadas nas plantações em estufas. Também produzem própolis, embora em quantidades reduzidas e com composição química ainda pouco estudada (MENEZES, 2005).

Embora produzam mel em menor quantidade, os meliponíneos são importantes por fornecer um produto que se diferencia do mel de *A. mellifera*, principalmente na doçura inigualável, sabor diferenciado, seguramente mais aromático e que possui consumidor alvo distinto o que possibilita alcançar preços elevados no mercado de méis (KERR, 1996; LEVY JÚNIOR, 1997; NOGUEIRA NETO, 1997). O interesse crescente pelo mel dos meliponíneos tem gerado um esforço no sentido de determinar as características físico-químicas dos diferentes méis produzidos pelas espécies que ocorrem no Brasil (PAMPONA, 1989; EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2003). O estudo realizado por LEVY JÚNIOR (1997) nos forneceu subsídios para a realização de nossos estudos sobre a ação antimicrobiana de própolis de meliponíneos, comparativamente ao de *A. mellifera* (FERNANDES JÚNIOR et al., 2001), o qual faremos comentários por ocasião da atividade antimicrobiana de própolis.

2.2. Aspectos gerais sobre a própolis

A própolis é empregada desde a antiguidade pelos diferentes povos como os assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (PEREIRA et al., 2002). O reconhecimento do efeito antisséptico da própolis é baseado no emprego desta na própria colméia, como, por exemplo, sobre predadores que as invadem e são mortos, mas cuja carcaça não é removida por ser pesada. Estas são cobertas com própolis pelas abelhas, com o intuito de prevenir que a colméia seja acometida por uma infecção bacteriana. A ação se assemelha ao processo de embalsamento empregado às múmias egípcias (SALATINO et al., 2005). Segundo Trevisan (1983) e Angerami (1991), a própolis é uma resina extraída de certos vegetais, de cor castanho-esverdeado, constituída por 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen.

É considerado um forte produto natural empregado na diminuição da abertura de entrada e saída da colméia, assim como para cobrir paredes internas

da colméia e interior das células para defendê-las dos micro-organismos, bem como possibilitar reparos dos favos estragados ou consolidar os favos móveis. Na Figura 1 são apresentadas ilustrações referentes a coleta de matéria para elaboração da própolis, a elaboração propriamente dita e própolis bruta sendo preparada para elaboração de seus derivados.

A própolis é resultante da coleta de substâncias de natureza gomosa, resinosa e/ou balsâmicas, recolhidas pelas abelhas especialmente de brotos, flores, cascas, látex, ramos, pólen e frutos, entre outras partes, de espécies vegetais presentes no ambiente em que se situa a colméia. As abelhas adicionam e modificam a composição dos materiais coletados, através de secreções próprias como a saliva, a partir da adição de ceras, ou ainda pelo processo de digestão do pólen pelas próprias abelhas (PINTO et al., 2001; **FERNANDES JÚNIOR et al., 2003**).

A sua coloração pode variar desde o creme ao pardo-escuro, passando por tonalidades de amarelo e verde. Algumas amostras se apresentam friáveis e de textura dura, podendo indicar a presença de teor elevado de resina. Por outro lado, outras se mostram elásticas e pegajosas, podendo indicar elevado conteúdo de ceras (FUNARI & FERRO, 2006).

Atualmente, a própolis é recomendada pela sua ação antimicrobiana, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora e antiinflamatória, por aumentar a resistência natural do organismo a infecções, e para o tratamento de úlceras gastroduodenais. Externamente pode ser aplicada no controle de dermatites causadas por fungos e bactérias. É utilizada em formulações comerciais, como cápsulas, géis, pó, extrato, enxaguantes bucais, e constituindo produtos da indústria de cosméticos (CASTALDO & CAPASSO, 2002). Além destas propriedades, Cueto (1991) relacionam também as propriedades antioxidante, antialérgica, desodorante, cicatrizante, hipertensora e termoestabilizadora.

Em outros estudos que abordaram as propriedades biológicas da própolis são destacadas as atividades: antibacteriana, (MOCHIDA et al., 1985; GHISALBERTI, 1979; VELIKOVA et al., 2000, PEPELJNJAK et al., 1985), antifúngica (DIMOV et al., 1991; SCHEIDEWIND et al., 1979; MURAD et al., 2002), antiviral (AMOROS et al., 1992; AMOROS et al., 1994), anestésica local



Figura 1. Fotos ilustrativas dos passos para elaboração da própolis de *Apis mellifera* até momento prévio ao preparo do derivado da própolis. <http://espaber.uspnet.usp.br/espaber/wp-content/uploads/2011/09/raw-própolis-with-mortar.jpg>. (Disponível em 04/04/2012)

(PAINTZ & METZNER, 1979), antiinflamatória (STREHL et al., 1994; MIYATAKA et al., 1997), antioxidante (SUN et al., 2000; ISLA et al., 2001), hepatoproteção (GONZALES et al., 1995), imunoestimulante (DIMOV et al., 1991) e citostática (FRENKEL et al., 1993).

A composição química da própolis é complexa e relacionada à diversidade vegetal encontrada em torno da colméia. Embora a própolis seja amplamente utilizada na medicina popular, a falta de padrões que avaliem de maneira precisa suas atividades farmacológicas, dificulta a padronização de produtos comerciais que garantam a sua eficácia e segurança terapêutica para humanos e animais (MENEZES, 2005). As suas características físico-químicas são influenciadas por inúmeros fatores, sendo estes referentes à própria amostra de própolis, local de coleta, clima e flora locais, além da espécie de abelha produtora. Estes aspectos interferem na composição deste apiterápico bem como em seus espectros de atividades biológicas (SOUZA et al., 2004; **FERNANDES JÚNIOR et al., 2006; MANTOVANI et al., 2008**). Tosi et al. (2007), em estudo onde foram analisadas 15 amostras de própolis de diferentes origens, reportaram que a porcentagem de quercetina, galangina, ácido caféico + crisina, e alguns compostos solúveis não identificados possuem influência sobre a atividade antimicrobiana de cada amostra, fazendo com que a Concentração Inibitória Mínima (CIM) seja variável e diretamente dependente da amostra utilizada nos ensaios.

Quatro compostos fenólicos foram verificados em amostras de própolis brasileira, sendo estes identificados como: (1) ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA); (2) 2,2-dimetil-6-carboxiethenil-2H-1 benzopirano (DCBEN); (3) ácido 3,5-diprenil - 4-hidroxicinâmico (PCT); e (4) 2,2-dimetil-6-carboxiethenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB) (MARCUCCI et al., 2001).

Pelo menos 200 compostos já foram identificados em diferentes amostras de própolis, sendo que até 100 compostos diferentes foram identificados numa única amostra de própolis. Dentre estes são destacados os ácidos graxos e ácidos fenólicos e seus ésteres, flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonóis diidroflavonois, chalconas), terpenos, β -esteróides, aldeídos aromáticos e álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados de estilbeno (GREENAWAY et al., 1990; GREENAWAY et al., 1991; AGA et al., 1994; BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 1995). Em um tipo de própolis brasileira, denominada própolis vermelha, foram identificados 14 compostos, sendo seis destes considerados inéditos em amostras

de própolis e caracterizados como fenólicos simples, triterpenoides, isoflavonóides, prenilados benzofenonas e um epóxido naftoquinona isolada também pela primeira vez de um produto natural (TRUSHEVA et al., 2006).

Segundo alguns autores, amostras de própolis do Brasil apresentam diferenças em suas composições químicas quando comparadas com amostras de zonas temperadas. Além disto, diferenças também entre própolis de zonas tropicais foram detectadas em função da flora local e o local de coleta. Dentre essas amostras de própolis é possível destacar a própolis verde, obtida a partir do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e, mais recentemente a própolis denominada vermelha, obtida na região norte do país (SALOMÃO et al., 2008). Além, disto mencionam os autores que enquanto a ação antimicrobiana da própolis européia se deve a ação de flavonóides e dos derivados do ácido cafêico, as de áreas tropicais destacam-se como compostos ativos os ácidos fenólicos e derivados prenilatados.

Bankova (2005) também relatou que as combinações diversas de compostos químicos apresentadas pelas amostras de própolis são responsáveis pelas atividades biológicas características de cada uma, ressaltando assim a necessidade de estudos com objetivos de comparar as atividades biológicas em função da origem geográfica, possibilitando assim uma padronização do uso e aplicações terapêuticas da própolis.

Se a composição de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA et al., 2004), **Sforcin et al., (2000)** relataram que a composição da própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade. Variações na composição também foram observadas entre amostras de própolis coletadas em uma mesma região, por diferentes raças de *A. mellifera* (SILICI & KUTLUCA, 2005).

Estudos têm revelado aspectos mais aprofundados sobre características e composição química de própolis. Silva et al., (2006) reportaram que a própolis obtida de *A. mellifera* em diferentes épocas do ano, assim como a própolis oriunda de diferentes colméias, apresentaram diferentes valores para a composição bromatológica e bioativa, tendo a própolis amostrada nos períodos de maior precipitação pluviométrica os melhores valores referentes aos compostos bioativos presentes.

Por outro lado, Garedew et al. (2004) reportaram que, mesmo tendo sido estudadas amostras de própolis de diferentes origens geográficas (Colômbia, Etiópia, Alemanha, Itália, Czaquistão, Polônia, Rússia e África do Sul) e dois preparos distintos dos extratos (etanólico e aquoso), todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana seja por inibir a multiplicação dos microorganismos testados ou por causar a sua morte deles. Também foi relatada a menor ação dos extratos sobre *Escherichia coli* e a menor sensibilidade dos fungos filamentosos em comparação as linhagens de bactérias e leveduras testadas. Concluíram os autores que a atividade antimicrobiana da própolis é significativamente complexa e representa o resultado das interações dos inúmeros componentes presentes nas amostras.

A atividade antibacteriana da própolis é reportada como sendo devido aos flavonóides, ácidos aromáticos e seus ésteres e é reportado que o mecanismo para esta propriedade é atribuído ao sinergismo entre os compostos fenólicos e outros compostos presentes (BURDOCK, 1998). Outros estudos revelaram também que a ação antimicrobiana da própolis ocorre em função da presença dos compostos fenólicos e novamente com o destaque para os flavonóides (MENEZES, 2005; ÂNGELO & JORGE, 2007; SIMÕES et al., 2008). A título de esclarecimentos, estes compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, especialmente em folhas, frutas, sementes e em outras partes da planta em forma de glicosídeos, ou agliconas, e que são reconhecidos pela sua ação antioxidante (ÂNGELO & JORGE, 2007; PACKER & LUZ, 2007). Durante muito tempo as preparações contendo estes compostos fisiologicamente ativos têm sido utilizadas para tratar doenças humanas, bem como tem sido objeto de investigação antimicrobiana. Além disso, vários grupos têm demonstrado sinergia entre flavonóides ativos, bem como entre tais flavonóides e antimicrobianos de uso já corrente (CUSHNIE & LAMB, 2005)

MANTOVANI et al. (2008) avaliaram a composição química de amostras de própolis coletadas na região Sul e Sudeste do Brasil, sendo que a amostra originária do Sul apresentou maior quantidade de flavonóides em sua composição, enquanto que a amostra proveniente do Sudeste apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais.

2.3. Propriedade antimicrobiana da própolis

Os relatos sobre ação antimicrobiana de produtos obtidos a partir do processamento da própolis são amplos. A primeira investigação sistemática quanto à propriedade antibacteriana da própolis foi realizada por Kikalvina em 1948 (GHISALBERTI, 1979), quando foi relatado a ação bacteriostática sobre *Staphylococcus aureus* e outras bactérias. Com base neste, muitos outros estudos foram realizados, utilizando-se de própolis de várias outras origens geográficas, formas de preparo dos extratos além de número significativo de micro-organismos.

Inúmeros estudos *in vitro* sobre ação antimicrobiana de própolis foram realizados a partir dos estudos pioneiros de 1948. Ficou estabelecida a ação sobre *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium segmentaris* (AZEVEDO et al., 1963), *Bacillus gartner*, *Escherichia coli*, *Bacillus dysenterique sonnei*, *Bacillus dysenterique schmitse* (DEREVICÉ et al., 1965), *Bacillus larvae* (LINDENFELSER, 1967), cocos Gram positivos e Gram negativos (SCHELLER et al., 1968), cepas de estafilococos, de estreptococos (CHERNYAK, 1973), *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (BECKEMEIER et al., 1973), *Proteus vulgaris*, *Bacillus alari*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella dublin* (LAVIE, 1975), *Streptococcus pyogenes* (SUCHY & SCHELLER, 1975).

Dentre os inúmeros estudos *in vitro* sobre a ação antimicrobiana da própolis, discutiremos a seguir aqueles realizados em nossos laboratórios, tomando como início o ano de 1995, quando realizamos a nossa primeira publicação sobre o assunto em questão.

Quanto ao estudo publicado no ano de 1995 por **FERNANDES JÚNIOR et al. (1995)** salientamos que este foi o nosso primeiro estudo realizado na linha de pesquisa sobre produtos naturais. Foi publicado no que é hoje um importante veículo de divulgação científica de estudos realizados com animais peçonhentos, o ***Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases-JVATITD***, que na época encontrava-se no seu segundo número. . Consideramos este estudo um marco importante de nossa produção científica, pois testamos um total de 392 amostras de micro-organismos sendo estes isolados de materiais biológicos humanos (118 *S. aureus*, 108 *E. coli*, 60 *Salmonella* Typhimurium, 50 *Candida albicans*, 23 *C. parapsilosis*, 19 *C. tropicalis* e 14 *C. guilliermondii*) frente a uma amostra de própolis de *A. mellifera* obtida na região de Botucatu e que foi

gentilmente fornecida pela Profa. Dra. Silvia Regina Cunha Funari, pesquisadora responsável pelo Setor de Apicultura do Depto de Produção Animal da FMVZ/UNESP/Botucatu. Com esta amostra foi preparado o respectivo extrato etanólico denominado 50% (50g de própolis bruta em 100 mL de etanol) e, através da metodologia da diluição em Agar Mueller Hinton (MHA), e semeadura das linhagens utilizando multi-inoculador de Sterr, foram determinados os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada linhagem, seguido do cálculo da CIM_{90%} para cada espécie microbiana estudada. Foram realizados também ensaios controles para verificação do efeito inibitório do etanol, ou seja, para o solvente utilizado no preparo do extrato de própolis. Na Figura 2 ilustramos os procedimentos para realização dos ensaios utilizando a metodologia da diluição em agar.

Neste estudo foi verificado que as bactérias Gram negativas foram menos susceptíveis ao extrato testado, como valores de CIM_{90%} ao redor de 22 mg/mL enquanto o *S. aureus* foi susceptível as concentrações ao redor de 1,0 mg/mL. As espécies de *Candida* apresentaram susceptibilidade variáveis, tendo o menor valor de CIM_{90%} sido obtido com as linhagens de *C. tropicalis* (2,1 mg/mL) e o maior (10,9 mg/mL) frente a *C. parapsilosis*. Acreditamos que este é um dos únicos estudos sobre ação *in vitro* de própolis em que houve preocupação em testar um número relativamente elevado de linhagens de uma mesma espécie microbiana. Com a parceria iniciada com o Setor de Apicultura da FMVZ/UNESP/Botucatu, foram possíveis outros estudos conforme mencionado a seguir utilizando outras amostras de própolis de *A. mellifera*.

Considerando que houve uma diferença significativa quanto ao potencial antimicrobiano da própolis de *A. mellifera* obtida na região de Botucatu/SP sobre as bactérias Gram positivas e Gram negativas entendemos que seria necessário demonstrar o efeito antimicrobiano desta própolis em função do tempo de contato das bactérias e extratos etanólicos utilizando a metodologia da curva de sobrevivência.

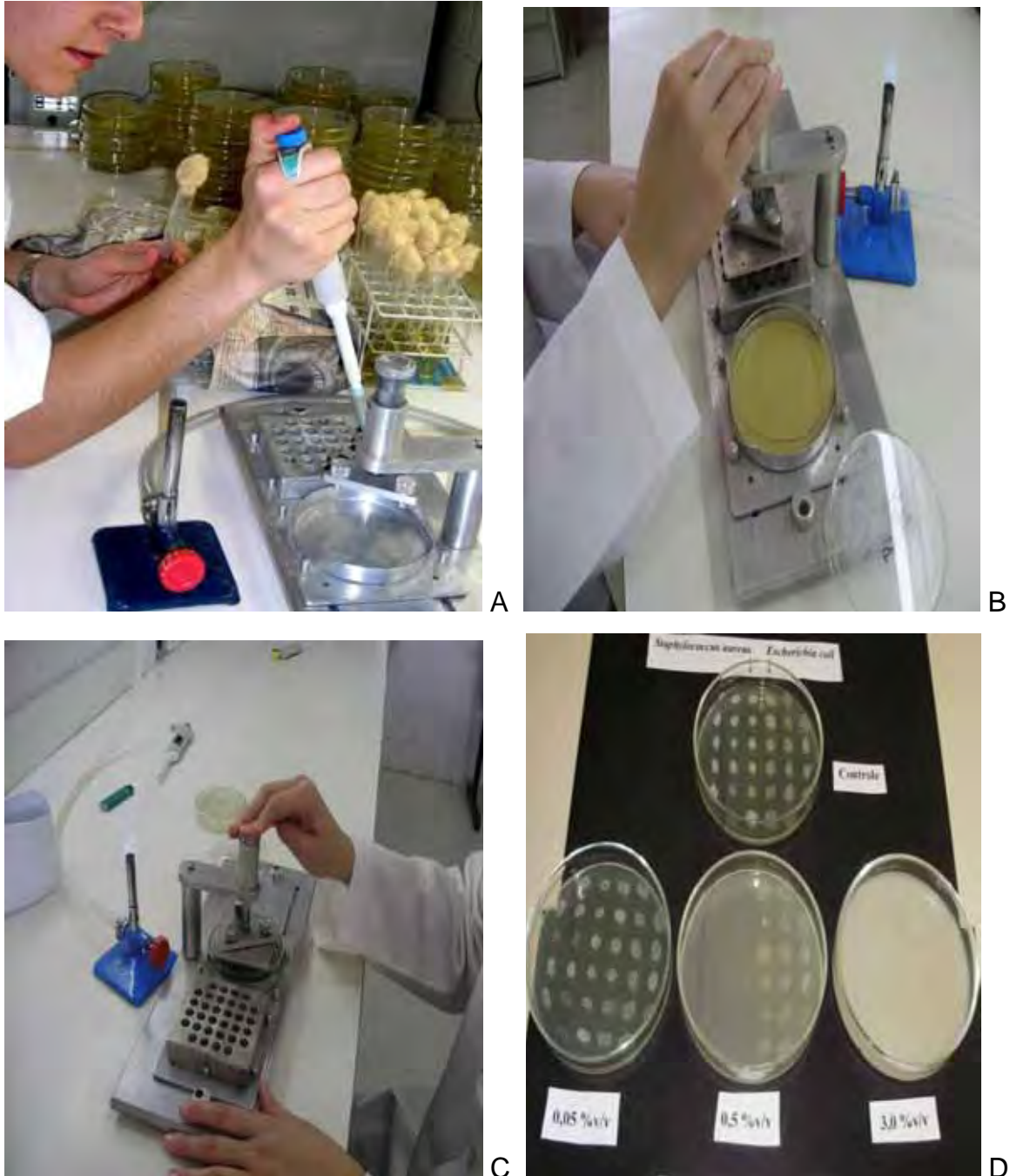


Figura 2. Aspecto geral dos ensaios pela metodologia da diluição em agar. (A) Preparo dos inóculos padronizados, (B e C) Uso do carimbador de Sterr e (D) Placas com crescimento bacteriano após 37° C/24 horas. (Fonte-ARY FERNANDES JÚNIOR)

Assim, em **FERNANDES JÚNIOR et al. (1997)** reportamos os resultados em estudo cujo objetivo foi então verificar redução na contagem (Unidades Formadoras de Colônias - UFC/mL) para uma linhagem padrão ATCC de *S. aureus* (numero 25923) e outra de *E. coli* (numero 35218) em função da CIM e do tempo. Foram testadas concentrações equivalentes aos valores de CIM_{90%} obtidos previamente para ambas as espécies bacterianas, bem como concentrações abaixo dos valores de CIM_{90%}. Tendo iniciado os ensaios, com uma contagem ao redor de 10⁵ UFC/mL, verificamos redução acentuada nas contagens bacterianas e marcante efeito bactericida do extrato quando foram utilizados os valores de CIM_{90%} e efeito bacteriostático quando testados os valores abaixo da CIM_{90%}.

Portanto, foi possível concluir em **FERNANDES JÚNIOR et al. (1997)** que a própolis, mesmo quando utilizada numa concentração abaixo da necessária, foi capaz de promover um efeito bacteriostático, o que consideramos também interessante quando se propõe obter um produto com potencial de uso como antimicrobiano. O efeito bacteriostático é importante do ponto de vista terapêutico, pois ao inibir a multiplicação bacteriana no hospedeiro, isto facilita a resolução do processo infeccioso pelo próprio organismo afetado pela doença.

Conforme mencionado na literatura a forma de preparo do extrato de própolis também pode influenciar na sua propriedade antimicrobiana. Assim, seguindo o que era preconizado para preparo de extratos de própolis, realizamos pesquisa no ano de 1997 com finalidade de testar os extratos alcoólicos de própolis de *A. mellifera* preparados de formas distintas sobre 61 amostras de *S. aureus*, sendo estas isoladas de casos clínicos humanos (**FERNANDES JÚNIOR et al., 2003**). Neste estudo foram preparados extratos etanólicos de própolis a 25% (25 g de própolis bruta/100 mL de soluções de etanol) utilizando soluções de etanol desde 10% até 100%, além de um extrato que consideramos tipo aquoso e que foi obtido pelo aquecimento da própolis bruta em água a 70°C por duas horas. Foram determinados os pesos secos dos extratos através da evaporação do solvente, obtendo-se assim os respectivos valores de mg/mL para as CIM_{90%}. Concluiu-se, de acordo com os valores de CIM_{90%}, obtidos pela metodologia da diluição em agar para um total de 61 linhagens de *S. aureus*, que não houve diferença significativa de ação anti-*S. aureus* quando os extratos foram preparados com soluções de etanol variando de 50 e 100%. Por outro lado, ficou também estabelecido que para o extrato denominado aquoso, e o preparado com 10% de etanol, a propriedade

antimicrobiana ficou prejudicada, pois apresentaram valores elevados de CIM_{90%} (acima de 5,0 mg/mL), quando feitas comparações com os extratos obtidos com as soluções de etanol acima de 50%, tendo estes apresentado valores de CIM_{90%} extremamente baixos, ou seja, entre 0,53 e 0,71 mg/mL. O estudo anterior teve desdobramento importante, e que embora não tenhamos publicado na época, realizamos estudo para preparo de monografia de trabalho de conclusão de curso (**COLOMBARI, 1997**) que também revelou importância tanto científica como comercial quando consideramos que a própolis é uma matéria prima extremamente valorizada e que o desenvolvimento de processos que visando otimizar o seu aproveitamento integral durante o preparo de seus derivados sem prejuízos para a sua propriedade antimicrobiana são bastante apreciados. No estudo realizado por **Colombari (1997)** procedemos preparo de extratos distintos, utilizando 50 g de própolis/100 mL de etanol; 30 g/100 mL etanol; 20 g/100 mL etanol, seguido de período entre três e sete dias para extração, seguido da filtração. Verificamos que os extratos não apresentaram diferenças significativas quanto ao poder inibidor sobre linhagens de *S. aureus* (n=60) e sobre *E. coli* (n=62). Assim sendo, foi possível concluir que a própolis poderia ter a sua utilização otimizada e que isto deveria obrigatoriamente passar pelo preparo dos seus derivados, que normalmente inicia-se com a obtenção dos respectivos extratos etanólicos.

Visando diversificar os estudos com a própolis, tivemos oportunidade de colaborar na realização da parte experimental do projeto de doutoramento do Prof. Dr. José Mauricio Sforcin, o que com isto permitiu iniciarmos uma parceria que tem resultado em publicações importantes sobre este assunto. Objetivando caracterizar a influência da sazonalidade da produção da própolis de *A. mellifera* sobre a propriedade antimicrobiana, realizamos estudo (**SFORCIN et al., 2000**) utilizando amostras de própolis coletadas durante um período de um ano as quais foram nomeadas amostras de primavera, de verão, de outono e de inverno. Com estas amostras foram preparados os respectivos extratos etanólicos a 30% (30g/100 ml etanol) e, com a metodologia da diluição em agar, foram determinados os valores de CIM_{90%} para amostras clínicas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium, totalizando 30 amostras. Verificou-se novamente a maior sensibilidade das linhagens de *S. aureus*, com valores de CIM_{90%} variando entre 0,4 e 0,6 %v/v, permitindo assim concluir que a sazonalidade da coleta não foi capaz de interferir de forma acentuada na propriedade antimicrobiana da própolis

de *A. mellifera* sobre esta bactéria. Quanto às demais espécies bacterianas também não foram verificadas diferenças significativas quanto à ação antimicrobiana em função da sazonalidade, embora neste caso os valores obtidos de CIM_{90%} tenham sido bem superiores (entre 5,70 e 5,76 %v/v para *P. aeruginosa*; 7,66 e 8,00 %v/v para *E. coli*; 6,00 e 8,00 %v/v para *S. Typhimurium*). Desta forma, embora na época do estudo não tenha sido feita uma análise química das amostras, foi possível concluir que nas condições estudadas, a sazonalidade não foi suficiente para promover uma alteração significativa na composição química da própolis, resultando assim numa ação antimicrobiana similar para as quatro amostras de própolis coletadas. Este estudo, de forma inédita, contou com a participação de uma pesquisadora da Bulgária, Dra. V. Bankova do Institute of Organic Chemistry-Centre of Phytochemistry, Sofia, Bulgaria, uma especialista em própolis, cuja parceria possibilitou a realização de inúmeros estudos e publicações na área.

Ainda referente ao material coletado que resultou na publicação **Sforcin et al. (2000)**, e objetivando com isto novamente caracterizar o efeito da sazonalidade das coletas, realizamos um estudo com 30 linhagens de duas espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. tropicalis*) (**SFORCIN et al., 2001**), também isoladas de casos clínicos humanos. Assim, como já verificado previamente, também não houve diferença significativa da ação antimicrobiana em função da sazonalidade, quando amostras de própolis foram coletadas nas estações do ano, embora os valores de CIM_{90%} para estes micro-organismos tenham se mantido na faixa entre 2 a 3%v/v, o que ainda foram considerados valores bem abaixo dos obtidos previamente com as bactérias Gram negativas. Assim, foi possível reforçar os comentários prévios que provavelmente não houve variação na composição química das amostras de própolis em função da época de sua coleta, quando considerado a mesma área de produção.

No mesmo ano de 2001, publicamos um estudo sobre ação antimicrobiana de própolis obtidas em colméias de abelhas do grupo meliponíneos (**FERNANDES JÚNIOR et al., 2001**). Os objetivos deste estudo foram definidos após participação em banca de defesa de mestrado do biólogo Norton Claret Levy JÚNIOR (LEVY JÚNIOR, 1997) do curso de Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências de Rio Claro/UNESP. Foram obtidas amostras de própolis das espécies *Nannotrigona testaceicornis* (iraí), *Tetragonisca angustula* (jataí), *Trigona spinipes* (arapuá),

Scaptotrigona sp (tiúba), *Partamona* sp (cupira), *Melipona scutellaris* (uruçu), *Melipona* sp (manduri) e *Melipona mandaçaia* (mandaçaia), além de também uma amostra de *A. mellifera*. Foram preparados os extratos etanólicos a 30% (30 g/100 mL de etanol, seguido de sete dias para extração a temperatura ambiente). Os ensaios de sensibilidade foram sobre linhagens de *S. aureus* (n=30), *Enterococcus* sp (n=30) e *E. coli* (n=30) e a metodologia utilizada foi a diluição em agar Mueller Hinton (MHA) para obtenção dos valores de CIM_{90%}. Novamente as bactérias Gram positivas foram mais susceptíveis que as Gram negativas e algumas própolis de meliponíneos foram mais efetivas sobre *S. aureus* que a de *A. mellifera* (0,38mg/mL), a exemplo da uruçu (0,23 mg/mL), manduri (0,17 mg/mL), cupira (0,14 mg/mL), mandaçaia (0,16 mg/mL). Sobre as linhagens de *Enterococcus* também foi verificada a melhor eficiência das própolis de manduri, cupira e mandaçaia (0,53, 0,23, 0,30 mg/mL respectivamente) em relação a *A. mellifera* (1,46 mg/mL). Quanto a *E. coli*, novamente as própolis de uruçu, manduri e cupira (5,33, 4,18, 5,06 mg/mL respectivamente) foram mais eficiente que a própolis de *A. mellifera* (12,05 mg/mL). Assim, concluímos que a própolis de algumas espécies de abelhas do grupo dos meliponíneos podem apresentar igual ou maior potencial antimicrobiano que a de *A. mellifera*. Por outro lado acreditamos que a questão comercial para estas abelhas, e seus produtos, deve ser considerada uma vez que a abelha *A. mellifera* apresenta todo um parque produtivo e tecnológico instalado, enquanto que para os produtos da colméia de meliponíneos ainda são obtidos de forma mais artesanal e considerado até mesmo como *hobby* por algumas pessoas, por serem estas abelhas não agressivas e desprovidas de ferrão. Na Figura 3 são mostradas fotos de algumas espécies de meliponíneos, inclusive numas das fotos é mostrado a forma quase artesanal de obtenção do mel destas abelhas.

Outro aspecto normalmente reportado é que sendo a própolis o resultado da coleta de material vegetal, este produto pode ter características distintas, ou próprias, em função do local de coleta, o que pode influenciar também na atividade antimicrobiana e em outras propriedades biológicas.



Figura 3. Fotos ilustrativas de espécies de Meliponíneos (Abelhas sem Ferrão). A-Uruçú (*Melipona scutellaris*), B-Tiúba (*Melipona cupressipes*), C-Jataí (*Tetragonisca angustula*).

Fonte-<http://www.meliponariodosertao.blogspot.com.br/>
(Disponível em 04/04/2012)

Desta forma, realizamos estudo para comparar a ação antimicrobiana de própolis de *A. mellifera* obtidas em regiões distintas do Brasil (**FERNANDES JÚNIOR et al., 2006**). Foram preparados extratos etanólicos a 30% (30 g/100 mL de etanol) e realizados ensaios para determinação da CIM sobre linhagens de *S. aureus* (n=61), *Enterococcus* sp (n=32), *E. coli* (n=65), *P. aeruginosa* (n=30) e *C. albicans* (n=32). Verificou-se novamente que as bactérias Gram positivas foram mais susceptíveis, juntamente com a *C. albicans*. Porém, considerando que o objetivo do estudo foi determinar o efeito antimicrobiano em função do local de coleta, concluímos que a amostra de própolis de *A. mellifera* obtida na região de Botucatu/SP, foi de forma geral mais eficiente quando comparada as obtidas nas regiões de Mossoró/RN e Urubici/SC embora a própolis de Urubici tenha sido a mais eficiente sobre as linhagens de *E. coli*. Neste estudo, embora não salientado no trabalho publicado, notou-se diferenças sensoriais entre as amostras, através de coloração e consistência das própolis de acordo com o local de coleta. Outros estudos também foram realizados tendo também como objetivo comparar a atividade antimicrobiana em função do local de coleta. Em um destes, as amostras de própolis obtidas na região nordeste (Mossoró/RN) e sul (Urubici/SC) do Brasil foram novamente testadas (**ORSI et al, 2005**) utilizando linhagens de *Salmonella*, sendo estas isoladas de alimentos (*Salmonella* Enteritidis - n=13) e de materiais biológicos humanos (*Salmonella* Thyphimurium - n=14). Após determinação das CIM para cada grupo bacteriano foram realizados ensaios para obtenção da curva de sobrevivência de cada espécie em relação às própolis estudadas, cujo objetivo foi verificarmos o efeito destas em função da concentração utilizada e tempo de contato frente aos respectivos extratos. Relatamos que o extrato da amostra de própolis de Mossoró foi mais efetivo que o de Urubici, embora o efeito observado tenha sido bacteriostático até aproximadamente 14 horas de experimentação, o efeito bactericida foi visualizado somente após 24 horas de contato quando os ensaios foram iniciados com uma concentração bacteriana ao redor de 10^6 UFC/mL. Vale destacar que no ensaio controle do etanol, o efeito obtido foi bacteriostático durante todo o período de experimentação, o que nos faz concluir que, embora tenha ocorrido menor susceptibilidade das Gram negativas, a própolis assim mesmo apresentou ação sobre estas bactérias mesmo tendo havido uma ação inibidora também do etanol presente no extrato. Novamente foram necessários elevados valores de CIM para haver a inibição do crescimento das

linhagens, ou seja, valores ao redor de 10 %v/v, o qual correspondeu a uma concentração ao redor de 200 e 250 mg/mL.

Em outro estudo, publicado por **Gonsales et al. (2006)**, objetivamos comparar 22 amostras de própolis de *A. mellifera*, obtidas nos estados de Goiás, Paraná e São Paulo, bem como relacionar os teores de flavonóides. Foram realizados ensaios utilizando a metodologia dos discos impregnados com 20 µL de extratos etanólicos de própolis, além de discos controles contendo também 20 µL de etanol 70%. Os discos foram colocados em placas de Petri inoculadas individualmente com uma linhagem ATCC de *S. aureus* (25923) e outra de *E. coli* (35218). Após incubação (35°C/24 horas), e feitas as medidas dos halos de inibição formados, verificou-se que 21 dos 22 extratos foram capazes de formar halos de inibição para a linhagem de *S. aureus*. A mesma eficiência não foi verificada para a linhagem de *E. coli*, sem a formação de halos para todas as amostras de própolis testadas. Foram realizados ensaios controles para etanol, os quais não formaram halos de inibição, e para drogas tais como ampicilina e tetraciclina. Estes resultados confirmaram relatos prévios sobre a maior sensibilidade de bactérias Gram positivas em relação à Gram negativas. Vale destacar que a metodologia dos discos tem sua utilização justificada quando se pretende fazer um estudo preliminar sobre um produto antimicrobiano natural, bem como quando o número de amostras a ser testado é significativamente elevado. Quanto aos teores de flavonóides, foi detectada uma variação significativa entre 0,05 a 0,63%. Um resultado interessante foi que a única própolis que não inibiu o crescimento do *S. aureus* foi exatamente aquela que apresentou o menor teor de flavonóide, ou seja, 0,05%. Isto reforça também o papel antimicrobiano dos flavonóides presentes nas amostras de própolis.

Em outro estudo, **Orsi et al. (2007)**, reportamos o efeito inibidor de amostras de própolis obtidas no Brasil e na Bulgária, sobre as linhagens de *Salmonella* isoladas de amostras biológicas de humanos (*Salmonella* Typhimurium – n=14) e de alimentos (*Salmonella* Enteritidis- n=13) e sobre duas linhagens padrões ATCC de *Salmonella* Thyphimurium (13311) e outra de *Salmonella* Thyphi (00238). A amostra de própolis da Bulgária foi cedida pela Dra. Vassya Bankova e a do Brasil pela Profa. Dra. Silva Regina Funari (FMVZ/UNESP/Botucatu). De acordo com os resultados de ação antimicrobiana, verificamos que ambas as amostras foram capazes de inibir tais linhagens, em concentrações inibitórias ao

redor de 220 mg/mL para a linhagem isolada de alimentos e ao redor de 250 mg/mL para as isoladas de materiais clínicos humanos. Desta forma confirmaram-se novamente os perfis distintos de sensibilidade de linhagens pertencentes ao mesmo grupo de bactérias.

De maneira geral, ficou estabelecido que a propriedade antimicrobiana da própolis, assim como também pudemos verificar com outros produtos naturais a serem abordados posteriormente, é passível de variações em função dos inúmeros fatores, sendo estes tanto edafo-climáticos como biológicos.

Outro aspecto também importante sobre os produtos naturais são as explicações sobre os mecanismos de ação destes sobre os micro-organismos, bem como também as possíveis interações entre estes produtos e drogas convencionais.

A atividade bactericida da própolis pode ser uma consequência da ação da mesma sobre a estrutura da parede celular, levando à bacteriólise parcial e formação de bactérias policarióticas. É capaz, também de desorganizar o citoplasma, causar alterações na membrana citoplasmática e inibir a síntese protéica (PINTO et al., 2001). SCAZZOCHIO et al. (2006) avaliaram a múltipla ação da própolis contra fatores de virulência presentes em algumas bactérias Gram positivas. Na presença de extrato de própolis houve diminuição da atividade das enzimas lipase e coagulase, observadas em linhagens de *Staphylococcus* sp e *Streptococcus* sp, isolados de casos clínicos humanos, e também na adesão do biofilme característico para *S. aureus*.

Quanto às possíveis interações com drogas antimicrobianas convencionais, apesar da escassez dos estudos, é possível relacionar alguns destes estudos. Segundo Detoma & Ozino (1991) foi possível verificar as três possíveis interações (sinergismo, antagonismo e indiferença) entre drogas quando extrato alcoólico de própolis foi incorporado ao meio de cultura previamente aos testes de sensibilidade pelo método da difusão dos discos. Foram testadas várias drogas e várias espécies bacterianas, sendo estas tanto Gram positivas como Gram negativas.

Outro estudo, utilizando metodologia da diluição tanto para o extrato alcoólico como para a droga antimicrobiana, com objetivo também de verificar interações destas substâncias sobre *S. aureus* foi realizado por Krol et al (1993). Uma concentração de 600 µg/mL de extrato alcoólico de própolis foi incorporado ao meio de cultura juntamente com concentração variadas de drogas antimicrobianas

tais como penicilina G, doxiciclina, estreptomicina, cloxacilina, cloranfenicol, cefradina, ampicilina e polimixina B. Relataram os autores que foram possíveis efeitos sinérgicos sobre a ação antibacteriana para estreptomicina e cloxacilina e efeito moderado sobre as demais drogas, exceto para ampicilina.

Segundo Strehl et al. (1994) foi verificado *in vitro* a inibição da enzima diidrofolato redutase pelo extrato aquoso de própolis, bem como concluiu-se que esta atividade deveu-se a presença de ácido cafêico na amostra estudada. A partir desta informação, e sendo esta enzima importante no metabolismo bacteriano para a síntese de ácido fólico, é possível acrescentar que desta forma a própolis estaria agindo de forma semelhante a uma droga antimicrobiana convencional, no caso o trimetoprim, que também age nesta rota metabólica.

O sinergismo foi estudado também entre extratos de própolis e drogas antimicrobianas por Stepanovic et al. (2003) utilizando 13 amostras de própolis de *A. mellifera*, obtidas em regiões da Sérvia. As metodologias adotadas foram a difusão e diluição. Reportaram os autores que o sinergismo ocorreu com todas as drogas testadas, sendo utilizadas 39 amostras de micro-organismos, incluindo bactérias multiresistentes a drogas e fungos. Reportaram também que a capacidade dos extratos de própolis em potencializar a ação antimicrobiana ocorreu especialmente para os antifúngicos, bem como destacaram também no estudo o interesse médico quanto ao uso combinado de derivados da própolis e drogas antimicrobianas.

Assim sendo, e considerando as possibilidades de interações *in vitro* entre produtos naturais e drogas convencionais de uso na terapêutica das doenças infecciosas, realizamos estudos que culminaram em publicações a partir do ano de 2005 (**FERNANDES JÚNIOR et al., 2005**), sendo que em todos estes objetivamos efeito sinérgico da própolis com drogas antimicrobianas convencionais. Verificamos a ocorrência de sinergismo entre extrato de própolis de *A. mellifera* da região de Botucatu/SP, frente a 13 drogas antimicrobianas utilizando as metodologias da difusão a partir de discos (Kirby & Bauer) e pelo E-teste. Os ensaios foram realizados inicialmente visando obtenção do valor de CIM_{90%} para um total de 61 linhagens de *S. aureus* isoladas de processos infecciosos humanos através da metodologia da diluição em agar. Feito isto, os ensaios de verificação de interações entre o extrato de própolis foram realizados adicionando ao meio de Mueller Hinton Agar (MHA), valores equivalentes a ¼ do valor do CIM_{90%} obtidos previamente e realizados dois tipos de antibiogramas, sendo estes considerados

controles (placa de Petri com meio de MHA sem adição do extrato de própolis) e antibiogramas tratamentos (placas de Petri com meio de MHA adicionados de volumes de extrato de própolis). Neste estudo sobre as interações possíveis compreenderam duas etapas sendo que na primeira foram realizados ensaios para um total de 13 drogas utilizando discos de uso em antibiogramas e, após análise estatísticas dos resultados obtidos, foram selecionadas nove drogas que novamente foram testadas quanto ao sinergismo, porém utilizando a metodologia do E-teste.

Verificamos neste estudo, pela metodologia do disco, o sinergismo entre o extrato de própolis com cinco drogas das 13 drogas testadas, sendo estas o CLO, GEN, NET, TET e VAN, enquanto que pela metodologia do E-Teste, observou-se novamente o sinergismo do extrato com as drogas CLO, GEN, NET, TET, além da CLI, que foi introduzida apenas nos ensaios utilizando as tiras de E-teste. Um resultado de importância deste estudo foi que houve prevalência de sinergismo da própolis com as drogas que interferem com a síntese de proteínas na bactéria por alterar a estrutura dos ribossomos. Este tipo de resultado também foi reportado quando, ao invés de própolis, os estudos para verificação de sinergismo foram realizados utilizando extratos de plantas, o que será discutido no capítulo seguinte deste texto. Como é possível salientar, estes resultados *in vitro* certamente deverão abrir linhas de pesquisas visando elucidar tal fenômeno observado. Na Figura 4 são mostradas fotos referentes a este estudo.

Após este estudo pioneiro outros foram realizados, sendo que em **Orsi et al. (2006)** testamos novamente a ocorrência de sinergismo, utilizando a metodologia da curva de sobrevivência, ou seja, foram feitas misturas de própolis e drogas antimicrobianas (amoxicilina, ampicilina e cefalexina) e após inoculação de linhagem bacteriana, foram feitas contagens bacterianas através do plaqueamento e obtenção dos valores de unidades formadoras de colônias (UFC) por volume de meio. Nesta pesquisa utilizamos amostras de própolis novamente obtidas no Brasil e também da Bulgária, obedecendo à proporção de $\frac{1}{4}$ dos valores respectivos de CIM obtidos para as drogas antimicrobianas testadas e para os extratos de própolis, utilizando para esta avaliação cepas padrões ATCC de *Salmonella Typhi* (00238).

Neste caso, os resultados revelaram sinergismo tanto para a própolis da Bulgária quanto para a amostra do Brasil frente às três drogas testadas. Porém, o

resultado diferencial neste estudo foi que para a própolis do Brasil o efeito sinérgico verificado foi bacteriostático enquanto para a amostra da Bulgária foi bactericida. Tal observação é importante, uma vez que em se tratando das combinações de antimicrobianos em concentrações abaixo que a prevista, o efeito sinérgico bactericida é mais interessante que o efeito bacteriostático. Assim, pudemos perceber que havia todo um universo a ser explorado quanto à questão de sinergismo entre produtos naturais e antimicrobianos.

Em outro estudo (**MANTOVANI et al., 2008**) objetivamos verificar a ocorrência de sinergismo entre própolis e drogas antimicrobianas utilizando a metodologia do E-teste e sobre linhagens de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) bem como procedemos a caracterização química (flavonóides e compostos fenólicos) dos extratos de própolis de *A. mellifera* obtidas em duas origens (Botucatu/SP e Urubici/SC). Após determinação dos valores de CIM para um total de 32 amostras de SCN, foram realizados os ensaios de sinergismo conforme o preconizado por **Fernandes Júnior et al. (2005)**. Verificamos a ocorrência de sinergismo para as própolis testadas, sendo que o índice de sinergismo obtido foi maior para a própolis de Urubici, ou seja, com seis das sete drogas avaliadas. Uma observação importante foi que a amostra de Urubici apresentou uma concentração maior de flavonóides (0,871 %) em relação a de Botucatu (0,59 %). Vale destacar também que a amostra de Urubici, embora tenha mostrado melhor perfil de sinergismo com as drogas testadas, apresentou um valor de CIM_{90%} de 1,63 %v/v enquanto a de Botucatu foi capaz de inibir os SCN numa concentração 0,83 %v/v, portanto, praticamente um valor 100% maior que a própolis de Botucatu. Assim sendo, foi possível concluir que o poder antimicrobiano maior ou menor do produto natural não implica diretamente na capacidade de propiciar uma potencialização das drogas antimicrobianas quando determinado o sinergismo entre os compostos antimicrobianos. Isto pode ser um aspecto interessante quando se procura produtos naturais com a capacidade de interferir positivamente no efeito inibidor da droga antimicrobiana.

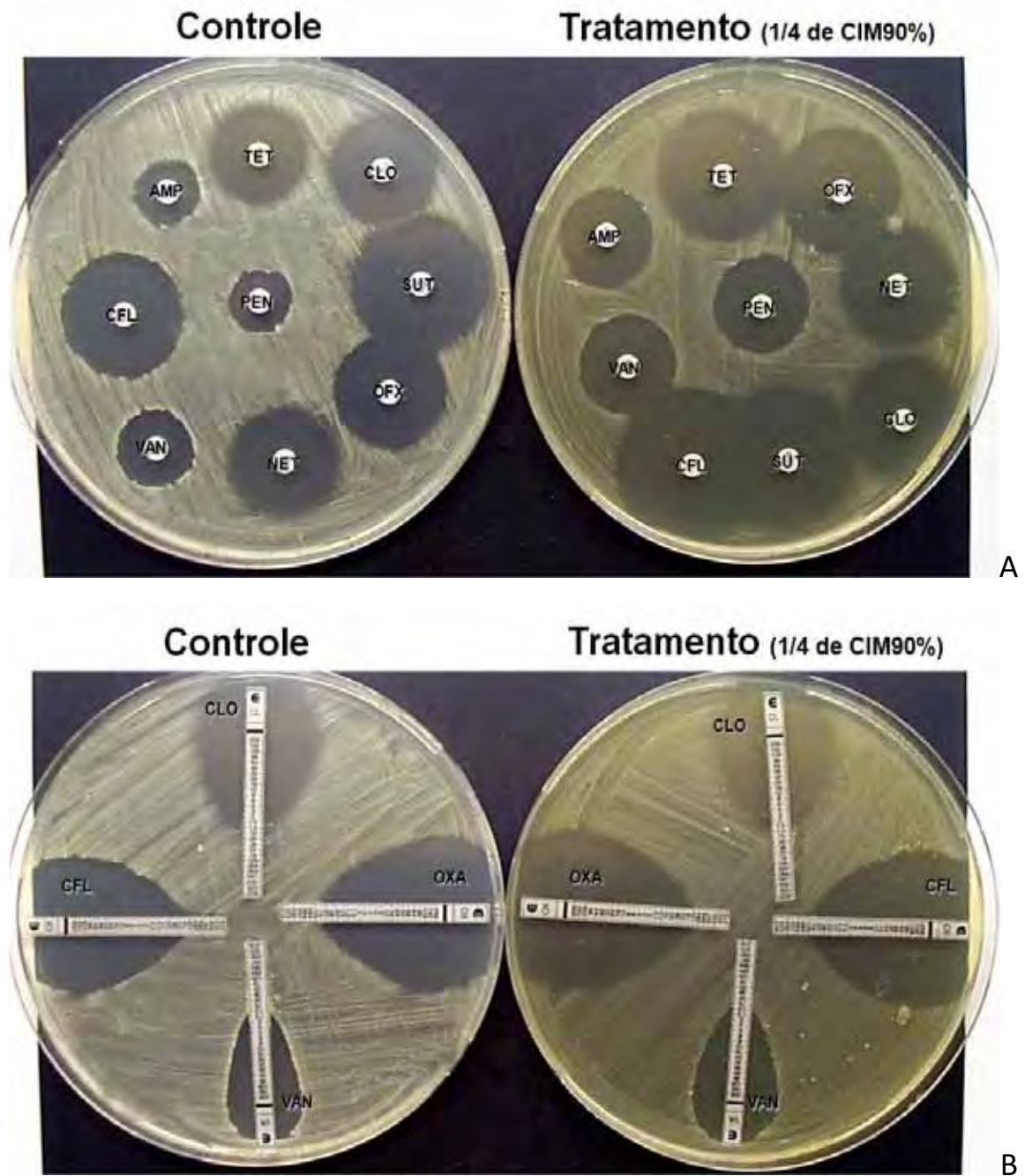


Figura 4. Aspecto geral dos ensaios realizados para verificação de sinergismo entre drogas antimicrobianas e própolis utilizando metodologia dos (A) discos e (B) E- test (Fonte- ARY FERNANDES JÚNIOR)

Considerando ainda a sequência dos estudos sobre extratos de própolis e sinergismo com drogas convencionais, destacamos outros dois estudos publicados recentemente (**ORSI et al., 2012 a,b**). Em **Orsi et al. (2012a)** relatamos que embora tenha sido verificado a ação antimicrobiana das amostras de própolis de *A. mellifera* testadas, sendo estas obtidas no Brasil e na Bulgária, sobre linhagens de *Salmonella* Typhi, não foram observados casos de sinergismo quando as drogas testadas foram aquelas relacionadas a inibição da síntese de DNA (ciprofloxacina e norfloxacina) e do ácido fólico (cotrimoxazol = sulfonamida e trimetoprim), embora ambos extratos tenham mostrado ação inibidora do crescimento da bactéria em estudo. Vale destacar que neste estudo os ensaios para verificação de sinergismo, pela metodologia da curva de sobrevivência, foram realizados tanto na combinação $\frac{1}{4}$ como também $\frac{1}{2}$ dos respectivos valores de CIM para as própolis e drogas antimicrobianas em estudo. A proposta em testar nas proporções $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ de CIM_{90%} teve por objetivo aumentar as possibilidades de ocorrência de sinergismo, aumentando de certa forma as concentrações utilizadas. Por outro lado, em **Orsi et al. (2012b)**, objetivamos testar nas mesmas condições mencionadas anteriormente, porém variando as drogas antimicrobianas, sendo que neste caso foram testadas aquelas com ação sobre a estrutura dos ribossomos (cloranfenicol, tetraciclina e neomicina). Novamente percebemos que os efeitos antimicrobianos obtidos foram bacteriostático sobre a *Salmonella* Typhi com a amostra do Brasil e bactericida com a da Bulgária. Assim, mais uma vez a própolis da Bulgária apresentou sinergismo com as três drogas antimicrobianas testadas.

Estes estudos novamente mostraram sua importância, pois mesmo utilizando outro tipo de bactéria, parece existir uma preferência para o sinergismo da própolis com drogas que interferem com a síntese de proteínas nas bactérias, conforme já verificado em **Fernandes Júnior et al. (2005)**.

Existem formulações de fitoterápicos obtidos a partir de associações entre produtos antimicrobianos naturais, a exemplo principalmente dos colutórios, obtidos a base de própolis, mel e extratos de plantas. Em estudo realizado por TAVARES et al. (2006) foram realizados testes sobre a toxicologia clínica de um fitoterápico com associação de plantas, mel e própolis (Saratosse®) que contém concentrações padronizadas de cada substância ativa das plantas utilizadas. Cada 100 g do produto mencionado continha extrato fluído de *Mikania glomerata* (5,0 g),

tintura de própolis (1,5 g), essência de *Mentha piperita* (0,3 g), óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (0,3 g), oleorresina de *Copaifera multijuga* (0,1g), solução de sorbitol (70,0 g) e mel de abelhas q.s.p. O experimento foi conduzido com a participação de 26 voluntários sadios, adultos, sendo 13 homens e 13 mulheres e cada voluntário atuou como seu próprio controle, considerando que seus próprios dados coletados no período de pré-estudo seriam comparados com os obtidos durante e após o tratamento. De acordo com os resultados obtidos o xarope foi bem tolerado, tendo sido relatados alguns eventos adversos classificados como possivelmente ou não atribuídos ao fitoterápico. Os índices de hemoglobina, TGO (Transaminase Glutâmico Oxalacética), TGP (Transaminase Glutâmico Pirúvica), creatinina e leucócitos não apresentaram diferenças significativas em relação ao pré-estudo. Todos os parâmetros bioquímicos estiveram dentro das suas respectivas faixas de normalidade. Os exames clínicos, eletrocardiográficos e laboratoriais não evidenciaram sinais de toxicidade nos órgãos e sistemas avaliados.

Desta forma, e considerando a possível inocuidade destas combinações, recentemente realizamos estudo (**PROBST et al., 2011**) cujo objetivo foi verificar a possibilidade de um produto natural potencializar o efeito de outro produto natural. No caso em questão, verificamos possíveis interações fazendo misturas entre extrato etanólico de própolis de *A. mellifera* da região de Botucatu/SP e óleos essenciais de plantas (canela, gengibre, cravo da índia e hortelã pimenta). Previamente foram determinados os valores de CIM_{90%} sobre 16 linhagens de *S. aureus* e 16 de *E. coli*, isoladas de materiais biológicos de pacientes do Hospital das Clínicas da FMB/UNESP.

De acordo com os resultados obtidos no estudo, o óleo essencial de canela foi o que revelou o maior potencial de ação antimicrobiana com os menores valores de CIM_{90%} sobre linhagens de *S. aureus* (1,22 mg/mL) e *E. coli* (0,96 mg/mL). Neste estudo foi utilizada a metodologia da curva de sobrevivência para verificação de sinergismo, com um tempo de experimentação de 24 horas para contato das bactérias e produtos naturais isoladamente e nas combinações definidas que foram nas proporções de ¼ de CIM para cada produto natural e verificamos para as combinações de extrato de própolis e gengibre ou extrato de própolis e menta, e combinações entre canela e gengibre ou canela e cravo da índia, foram aquelas que apresentaram indícios de efeitos antimicrobianos potencializados. Salientamos

também que pretendemos em estudos futuros elucidar as composições químicas geradas após as combinações efetuadas, pois caracterizar estas novas combinações fitoquímicas em comparação com os produtos naturais isoladamente é aspecto importante em se tratando de produtos naturais bem como testar tais combinações nos ensaios *in vivo*.

De forma geral, as pesquisas realizadas com própolis em nossos laboratórios, têm mostrado dados interessantes sobre este importante produto natural, que é já considerado um apiterápico por alguns autores. Quanto a sua composição química, embora existam inúmeros artigos publicados, ainda consideramos necessário um melhor detalhamento quanto aos compostos presentes e os respectivos mecanismos de ação que culminam com a inibição do crescimento ou morte microbiana.

Assim sendo é possível citar Sforcin & Bankova (2011) que mencionam que a eficácia da própolis, seja *in vitro* ou *in vivo*, tem revelado as suas propriedades terapêuticas. Porém relataram os autores que deve ser definida uma estratégia para a utilização deste produto das abelhas e que para isto devem ser levados em conta: **(a)** natureza química das amostras de própolis; **(b)** a sua eficácia deve ser comparada com parâmetros já bem estabelecidos bem como os controles positivos e negativos, embora as possíveis interações entre própolis e outros medicamentos devam ser investigadas em seres humanos; **(c)** a investigação clínica é necessária para avaliar o potencial da própolis em pacientes ou indivíduos sadios, para compreender em que condições a própolis pode promover a saúde. Assim, todos os resultados já obtidos mostram a importância destas pesquisas, com repercussão não só para os leitores e pesquisadores da área que carecem de esclarecimentos sobre o real potencial da própolis, mas também para a indústria farmacêutica, que tem como base a busca por novos medicamentos.

2.4. Aspectos gerais sobre o mel

Embora o mel não tenha sido objeto de estudos mais aprofundados em nossa linha de pesquisa, tivemos oportunidade de participar em um projeto de doutoramento (**CAMARGO, 2001**) orientando a realização dos ensaios com mel de

A. mellifera objetivando sua ação antimicrobiana. Assim alguns comentários sobre este importante produto da colméia são mencionados a seguir.

O mel, um produto natural elaborado por abelhas a partir do néctar das flores, que é coletado e transformado por elas por meio de dois processos básicos, um físico, evaporação da água e outro químico, adição de enzimas. É um dos produtos da colméia mais usados, tanto *in natura* quanto em diversas preparações industrializadas (KOMATSU et al., 2002). Além disto, a quantidade de mel que pode ser obtida de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar e, ainda, com a concentração e proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar. A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar de cada espécie vegetal produtora, conferindo-lhe características específicas enquanto que as condições climáticas e o manejo do apicultor têm influência menor (MACHINI et al., 2005).

Quanto à ação antimicrobiana do mel, é relatado que a principal substância responsável pela inibição do crescimento microbiano é o peróxido de hidrogênio, sendo que a sua quantidade é dependente tanto dos níveis de glicose-oxidase como da catalase no mel, uma vez que esta enzima destrói o peróxido de hidrogênio (WESTON et al., 2000). Segundo Molan (1992) e Wahdan (1998), são responsáveis também pela propriedade antimicrobiana alguns fatores físicos, como por exemplo, a sua alta osmolaridade, considerando que muitas bactérias têm seu crescimento inibido por uma atividade água (a_w) baixa; a acidez e fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras como por exemplo substâncias voláteis. Dentre as substâncias voláteis destaque é dado para os flavonóides e ácidos fenólicos, sendo que estes compostos voláteis têm origem no néctar além de contribuírem para o aroma das flores. Embora a variedade destes componentes seja grande, sua quantidade no mel é muito pequena, o que leva a concluir que estes não têm uma participação significativa nas propriedades antibacterianas, pelo menos nos níveis de ocorrência nos méis (WESTON, 2000).

De acordo com Amiot et al. (1989); Tomáz-Barberán et al. (1993); Andrade et al. (1997), a composição fenólica do mel é essencialmente similar a encontrada na própolis, sendo que os flavonóides encontrados no mel são derivados da própolis, mas em uma proporção 1000 vezes menor (FERRERES et al., 1992). Segundo estes autores, a contribuição desses compostos fenólicos na atividade

antibacteriana do mel é pequena, se comparada com o papel, por exemplo, do peróxido de hidrogênio.

Em estudo recente, Halawani & Shohayeb (2011) relataram efeito antimicrobiano de amostras de méis consumidos na Arábia Saudita sobre bactérias Gram positivas e negativas, inclusive sobre espécie de micobactéria. Verificaram que a *P. aeruginosa* foi a Gram negativa mais sensível enquanto a *Klebsiella pneumoniae* foi a menos sensível. O *Streptococcus pyogenes* foi o Gram positivo mais sensível. O *Mycobacterium phlei* apresentou uma sensibilidade intermediária em relação aos dois grupos bacterianos mencionados. Também foi reportado que as bactérias Gram positivas foram mais susceptíveis que as Gram negativas. Este tipo de resultados tem sido verificado em inúmeros estudos, inclusive os realizados em nossos laboratórios quando foram testados outros produtos naturais além do mel.

Assim sendo, em estudo realizado por **Camargo (2001)**, a atividade antimicrobiana de mel foi verificada em nosso laboratório tendo o mel sido produzido por um núcleo de *A. mellifera*, do tipo africanizada, confinado em ambiente fechado, cuja única fonte floral era a planta *Lippia alba*. As instalações para obtenção da amostra de mel foram feitas na Fazenda Experimental São Manoel, UNESP, localizada na cidade de São Manoel, SP, onde foi montado um recinto com 150 m², utilizando tela de nylon. Neste local foi feito o plantio de um total de 200 plantas de *Lippia alba*. Um núcleo de *A. mellifera*, tipo africanizada, foi mantido confinado nesta área, e o mel obtido nesta condição foi testado para verificação da ação inibidora sobre *S. aureus* e *E. coli* utilizando metodologia da diluição em caldo BHI. De acordo com as concentrações testadas, entre 5 e 80 %v/v, verificou-se, através de sub-culturas para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), que o mel testado inibiu o crescimento bacteriano em concentrações elevadas, sendo estas ao redor de 30 %v/v.

Embora o mel de *Apis mellifera* não tenha sido um dos produtos antimicrobianos naturais que tivemos oportunidade de considerarmos tal produto de forma mais aprofundada, estudos futuros são imaginados visando sua utilização como veículo na formulação de fitoterápicos com finalidade de potencializar a ação antimicrobiana de outros derivados antimicrobianos naturais.

3. ANEXOS DAS PUBLICAÇÕES SOBRE AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS

A sequência de artigos apresentada a seguir representa uma parte das publicações com própolis, segundo ordem cronológica. Algumas publicações mencionadas no texto referem-se a orientações que foram finalizadas como dissertações, teses, monografias de conclusão de curso ou apenas orientações de iniciação científica. Assim, são apresentadas as publicações que considero de maior relevância em minha linha de pesquisa.


Anexo 1

FERNANDES JÚNIOR, A, SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A M. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. ***Journal of Venomous Animals and Toxins***, v.1, n.2, p.63-69, 1995.

J. Venom. Anim. Toxins vol. 1 n. 2 Botucatu 1995 Pág. 63-65

Original paper

***IN VITRO* ACTIVITY OF PROPOLIS AGAINST BACTERIAL AND YEAST PATHOGENS ISOLATED FROM HUMAN INFECTIONS**

A. FERNANDES Jr.^{1,3}, M.F. SUGIZAKI¹ , M.L. FOGO¹ , S.R.C. FUNARI^{2,3} , C.A.M. LOPES^{1,3} 

¹ Department of Microbiology and Immunology of the Institute of Biosciences of Botucatu - UNESP, Botucatu, State of São Paulo, Brazil, ² Department of Production and Animal Exploration of the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of Botucatu - UNESP, Botucatu, State of São Paulo, Brazil, ³ Center for the Study of Venoms and Venomous Animals - CEVAP - UNESP, Botucatu, State of São Paulo, Brazil.

ABSTRACT. The *in vitro* activity of propolis against 118 *Staphylococcus aureus*, 108 *Escherichia coli*, 60 *Salmonella typhimurium*, 50 *Candida albicans*, 23 *Candida parapsilosis*, 19 *Candida tropicalis* and 14 *Candida guilliermondii* isolated from human infections was studied by the agar dilution method. Among the bacteria, the Gram-negative were the least susceptible organisms showing minimal inhibitory concentration (MIC) for 90% of the strains tested ranging from 22.5 mg/ml - 10,2% V/V to 23.1 mg/ml - 10.5% V/V. The MIC's for *Candida* ranged from 0.80 mg/ml to > 11 mg/ml (0.40% V/V to > 5.0% V/V), the strains of *C. parapsilosis* being the least susceptible. The relative order of susceptibility among all isolates, was:

S.aureus > *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. guilliermondii* > *C. parapsilosis* > *S. typhimurium* > *E. coli*.

☑ **KEY WORDS:** propolis, antimicrobial activity, bacteria, yeast pathogens, *Candida sp*

INTRODUCTION

Propolis is a resinous hive product collected by bees known to possess several significant pharmacological properties⁽²⁾. Because of propolis diverse biological activities and increasing industrial interest, its chemical composition is of great importance. Furthermore, investigations have shown that individual compounds such as the flavonoids⁽¹⁾ are responsible for spasmolytic (quercetin, kaempferol and pectolinargenin), antiinflammatory (acacetin), antiulcerative (apigenin) or antimicrobial (pirocembrin and galangin) activities^(2,3).

Since many reports dealing with propolis are not available to most readers, except as abstracts, and most of them are published by eastern European Journals, and a few available in Brazil^(6,10), this study was undertaken to compare the sensitivity of some significant bacterial and yeast pathogens from human infections with the antimicrobial activity of propolis produced in hives, maintained and controlled in the University apiary.

MATERIAL AND METHODS

PREPARATION OF PROPOLIS SOLUTION FOR TESTING: Samples of propolis were obtained from hives maintained and controlled by the technical staff of the Department of Production and Animal Exploration of the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of Botucatu, UNESP. After screening and homogenization procedures, samples were carried out from the production site to

the laboratories of the Department of Microbiology and Immunology of the Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP in polyethylene buckets with tight-fitting lids and stored in the dark at 5°C. Solutions of propolis for testing were prepared aseptically and protected from bright light to prevent photo-degradation. For its preparation, the product "in natura" was dissolved by stirring it in ethanol 96° GL (MERCK) and submitted to filtration. The final concentration in each main solution was calculated to yield a standard of 50% (V/V), which corresponded to an amount of 220 mg/ml of propolis.

TEST ORGANISMS: Strains of bacteria and yeast pathogens for testing were as follows: *Staphylococcus aureus* (No. = 118), *Escherichia coli* (No. = 108), *Salmonella typhimurium* (No. = 60), *Candida albicans* (No. 50), *Candida parapsilosis* (No. = 23), *Candida tropicalis* (No. = 19) and *Candida guilliermondii* (No. = 14), all sequentially isolated from clinical specimens of patients treated at the University Hospital of the School of Medicine of Botucatu, UNESP. The panel of microorganisms was identified by current standard microbiological methods according to Koneman et al.⁽⁴⁾, and Kreger-Van Rij⁽⁵⁾.

SUSCEPTIBILITY TESTING: Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by the agar dilution method was performed following the National Committee for Clinical Laboratory Standard guidelines ^(7,8). Strains of bacteria were grown in Brain Heart infusion Agar (Difco) and yeasts in Sabouraud Dextrose Agar (Difco) at 35°C/24 h. After incubation, five colonies of each strain were suspended in 5 ml of sterile 0.85% Phosphate Buffer Solution (PBS), and then the suspensions were diluted 1/10 and 1/100 in PBS to yield a final inoculum of approximately 5 x 10⁵ UFC/ml for the bacteria and 5 x 10⁴ cells/ml for yeasts. By using the standardized main solution, serial concentrations of propolis were achieved (% V/V) in plates containing Sabouraud Dextrose Agar and Mueller Hinton Agar for the yeasts and bacteria, respectively, as follows: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, and additional concentrations of 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.5 (%V/V) for the bacteria tested. Each antimicrobial test also included a

duplicate of plates containing the culture medium plus ethanol in correspondent volumes to obtain intermediary and final concentrations of propolis as a control of the solvent antimicrobial effect. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* K12 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 were used as control reference strains. After the inoculation procedures by using a multiloop replicator, plates were incubated at 35°C/24 h and MIC endpoints were read as the lowest concentration of propolis that resulted in no visible growth or haze on the surface of the culture medium. Populational analyses of data were carried out by calculating the MIC for 50% and 90% of the strains of each group of microorganisms tested.

STATISTICAL ANALYSIS: Statistical analysis of the MIC data was carried out by using the mean and median values as measures of central tendency and standard deviation (SD) and percentages [(P25%-P75 % among which 50% of the observations are seen)] as measures of variability. Comparison of MIC data among the yeasts was calculated using the analysis of variance with the F statistics. Contrasts among pairs of means were analyzed by the method of Tukey⁽¹¹⁾.

RESULTS AND DISCUSSION

The MIC₅₀ and MIC₉₀ as well as the MIC range are shown in **Table 1**. MIC's 90% for the bacterial species varied from 1.2 mg/ml (0.6% V/V) to 23.1 mg/ml (10.5% V/V). These data do not agree with those of Miller & Lilenbaum⁽⁶⁾ who observed inhibitory concentrations of propolis in the range of 3.3 mg/ml for *S. aureus* and 5.8 mg/ml and 7.2 mg/ml for *E. coli* and *Proteus mirabilis*, respectively. These authors also reported a mean difference between the inhibitory and bactericidal concentrations with an equivalence of 8-10 times to each other. On the other hand, our data confirm those of the literature which emphasize the lower sensitiveness of the Gram-negative species compared to Gram-positive^(2,6) ones.

TABLE 1. Antimicrobial susceptibility of bacteria and *Candida* sp to propolis.

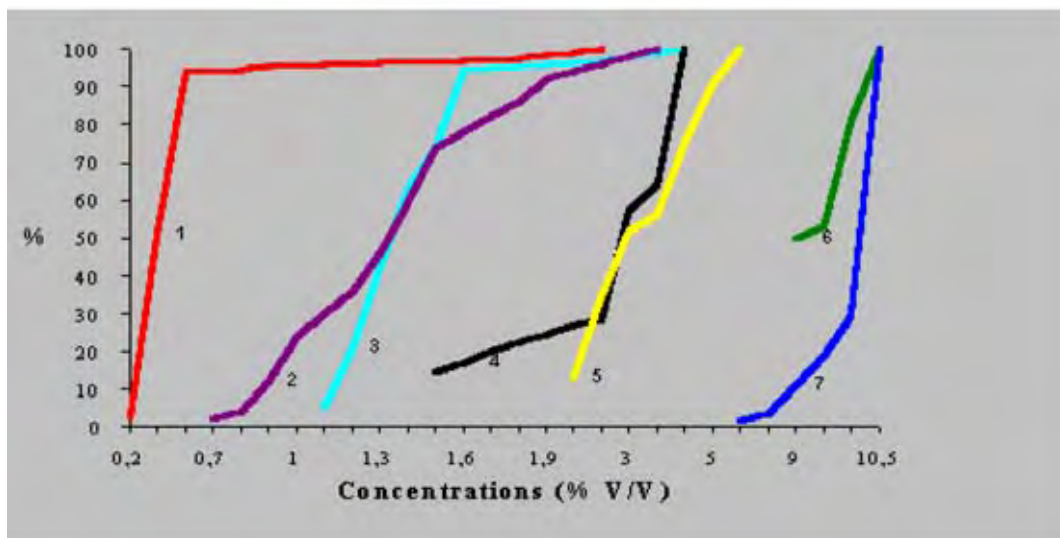
MICROORGANISMS	No.	MIC 50%		MIC 90%		RANGE	
		mg/ml	% V/V	mg/ml	% V/V	mg/ml	% V/V
<i>S. aureus</i>	118	0.87	0.39	1.20	0.60	0.40 - 5.50	0.20 - 2.50
<i>E. coli</i>	108	19.80	9.00	23.10	10.50	17.60 - >23.10	7.50 - >10.50
<i>S. typhimurium</i>	60	19.80	9.00	22.50	10.20	19.80 - 23.10	9.00 - 10.50
<i>C. albicans</i>	50	2.70	1.20	3.80	1.70	1.30 - 6.60	0.60 - 3.00
<i>C. parapsilosis</i>	23	6.46	2.93	10.90	4.90	2.20 - >11.00	1.00 - >5.00
<i>C. tropicalis</i>	19	1.60	0.73	2.10	0.90	0.80 - 3.96	0.40 - 1.80
<i>C. guilliermondii</i>	14	6.30	2.80	9.60	4.40	3.30 - 9.90	1.50 - 4.50

Among the tested yeasts, *C. albicans* and *C. tropicalis* showed a higher susceptibility than *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*. MIC's for *C. albicans* (3.8 mg/ml - 1.7% V/V) and *C. tropicalis* (2.1 mg/ml - 0.9% V/V) were partially similar to those obtained by Souza *et al.*⁽⁹⁾, who observed that the susceptibility of *C. albicans* ranged from 1.2 mg/ml to 2.56 mg/ml, considering both the fungistatic and fungicid effects. Data on some *Candida* species, such as *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* are not available in the literature for a comparative analysis. However, *C. parapsilosis* strains (10.9 mg/ml - 4.9% V/V) were only inhibited by concentrations twice as low as those for Gram-negative bacteria.

In this study, there were also significant statistical differences between susceptibility patterns of Gram negative and Gram-positive bacteria, as well as among the *Candida* species. MIC's for *C. albicans* and *C. tropicalis* were significantly different from those for *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii*, with differences based on median and mean response values ($F = 60.32$ and $p < 0.001$). The relative order of susceptibility based on the cumulative percentuals of microorganisms inhibited by the respective concentrations of propolis was: *S.*

aureus > *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. guilliermondii* > *C. parapsilosis* > *S. typhimurium* > *E. coli* (**Figure 1**).

FIGURE 1. Cumulative percentual of microorganisms inhibited by the respective concentrations of propolis.



1 *S. aureus* 2 *C. albicans* 3 *C. tropicalis* 4 *C. guilliermondii*
 5 *C. parapsilosis* 6 *S. typhimurium* 7 *E. coli*

Since variations in the susceptibility to propolis among several microorganisms have been reported, but not their specific mechanisms of action, further studies are needed to explain whether the cell structure and permeability to such compounds or even specific targets in the cell enzymatic systems are involved in microbial susceptibility.

REFERENCES

- 01 BANKOVA VS., POPOV SS., HAREKOV NL. A study on flavonoids of propolis. *J. Nat. Prod.*, **1983**, **46**, 471-9.
- 02 GHISALBERTI EL. Propolis: a review. *Bee World*, **1979**, **60**, 9-8.
- 03 HAVSTEEN B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, **1973**, **32**, 1141-8.
- 04 KONEMAN EW., ALLEN SD., DOWELL JR UR., JANA WM., SOMMERS HM., WINN JR. WC. *Diagnostic microbiology*, Philadelphia: J.B. Lippincott, **1988**, 980.
- 05 KREGER-VAN RIJ NJW. The yeasts: a taxonomic study. In: KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 3.ed. The Yeasts. The Netherlands: Elsevier, **1987**: 963.
- 06 MILLER A., LILENBAUM W. Propolis. Avaliação da ação antimicrobiana *in vitro*. *Cienc. Med.*, **1988**, **7**, 29-31.
- 07 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Antifungal susceptibility testing. Villanova, **1986**. Committee Report, v.5, n.7
- 08 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Standard methods or dilution antimicrobial susceptibility test or bacteria grow aerobically. Tentative standard M.J-T2. Villanova, **1988**.
- 09 SOUZA NETO BA., SOUZA ET., LILENGAUM W., SANTOS CS., SILVA LCS. Ação da propolis perante *Candida albicans*. *Cienc. Med.*, **1989**, **8**, 39-42.
- 10 SZEWCZAK EH., GODOY GF. Estudo comparativo entre a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* a própolis e antibióticos. *Apic. Bras.*, **1984**, **3**, 28-9.
- 11 ZAR JH. *Biostatistical analysis*. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, **1984**: 717.



CORRESPONDENCE

TO:

C.A.M. LOPES, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - CEP 18.618-000 - Botucatu - São Paulo - Brasil.

Anexo 2

SFORCIN, J.M., **FERNANDES JÚNIOR, A.**, LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.73, p.243-249, 2000.



Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity

J.M. Sforcin ^{a,*}, A. Fernandes Jr ^a, C.A.M. Lopes ^a, V. Bankova ^b,
S.R.C. Funari ^a

^a Department of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil

^b Centre of Phytochemistry, Institute of Organic Chemistry, Bulgarian Academy of Sciences, 1113, Sofia, Bulgaria

Received 12 December 1999; received in revised form 4 July 2000; accepted 29 July 2000

Abstract

The behavior of microorganisms towards the antibiotic action of propolis has been widely investigated. Since reports dealing with seasonal effect on propolis activity are not available, this assay was carried out aiming to observe the *in vitro* antimicrobial activity of propolis, collected during the four seasons, on bacterial strains isolated from human infections. Dilution of ethanolic extract of propolis (EEP) in agar was the method performed, with serial concentrations ranging from 0.4 to 14.0% (% v/v). The behavior of some bacteria was analysed according to the incubation period in medium plus propolis, and the survival curve was plotted. It was verified that the growth of Gram-positive bacteria is inhibited by low propolis concentrations (0.4%) whereas Gram-negative bacteria were less susceptible to this substance, the minimal inhibitory concentration ranging from 4.5 to 8.0%. There was no significant difference with regards to the seasonal effect on the survival curve of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; after incubation with propolis, there was an efficient antimicrobial action, mainly towards Gram-positive bacteria. © 2000 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Propolis; Season; Bacteria; Antimicrobial activity

1. Introduction

Propolis has attracted much attention in recent years as a useful substance applied in medicine and cosmetics, even if it is known in folk medicine since ancient times. Its antimicrobial property has been widely investigated, confirming its antibacterial, antiviral, antifungal, and antiprotozoan activities (Marcucci, 1995).

Focht et al. (1993) observed the bactericidal propolis effect *in vitro* against agents causing upper respiratory tract infections. Grange and Davey (1990) reported that propolis is active against Gram-positive bacteria, showing limited activity against Gram-negative ones. These findings were also verified by Dobrowolski et al. (1991), who observed its fungicidal activity, mainly against dermatomycoses. Lilenbaum and Barbosa (1994) observed the fungistatic and fungicidal effects of propolis, especially the susceptibility of yeast to this product.

* Corresponding author.

Amoros et al. (1992b) investigated the *in vitro* antiviral action of propolis, concluding that the synergism of its components may be responsible for its several biological properties. The antiviral activity of propolis was also observed by Amoros et al. (1992a), Serkedjieva et al. (1992) and Tatefuji et al. (1993).

Works by Fernandes et al. (1995) demonstrated the antibacterial and antifungal activities of propolis, comparing the susceptibility of microorganisms to different concentrations.

Propolis extracts have been reported to potentiate some antibiotic effects (Hernandez and Bernal, 1990; Krol et al., 1993), attributing the antibacterial propolis activity mainly to flavonoids or to a synergism between some components.

The goal of this assay was to investigate the effect of the season on the antibacterial activity of Brazilian propolis, since there are no data in the literature concerning this. Thus, Gram-positive and Gram-negative bacteria behavior was analysed in increasing concentrations of propolis, in order to determine the minimal inhibitory concentration for microbial growth. The survival curve was also analysed, according to the incubation period in culture medium and propolis obtained in each season.

2. Methodology

2.1. Propolis samples

Propolis was collected in the Beekeeping Section of the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of Botucatu, UNESP. Propolis samples were obtained from colonies of africanized honeybees (*Apis mellifera*) and collected over a year from plastic nets. After each month, nets were taken and frozen to promote propolis removal (Toth, 1985). Samples were pooled according to the four seasons.

2.2. Ethanolic extracts of propolis

Propolis obtained in each season was ground and 30% ethanolic extracts of propolis (EEP)

were prepared (30 g of propolis completing the volume to 100 ml of 95° ethyl alcohol), protected from bright light, with moderate shaking, at room temperature (Sforcin et al., 1995). After a week, extracts were filtered and diluted in culture medium to carry out the susceptibility test and the survival curve.

2.3. Bacteria strains

Thirty bacteria strains, isolated from clinical specimens of patients treated at the University Hospital of the School of Medicine of Botucatu, UNESP, were used as follows: *Staphylococcus aureus* ($n = 15$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 5$), *Escherichia coli* ($n = 5$) and *Salmonella typhimurium* ($n = 5$).

Microorganisms were identified by current standard microbiological methods according to Konecman et al. (1988).

2.4. Susceptibility test

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by the agar dilution method was performed, following the National Committee of Clinical Laboratory Standard guidelines (NCCLS, 1985).

Bacterial strains were grown in Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Oxoid) at 37°C/24 h. After incubation, five colonies of each strain were suspended in 5 ml of sterile saline and diluted to yield a final inoculum of approximately 5×10^5 CFU/ml.

Serial concentrations of propolis from each season were achieved (% v/v) in plates containing Mueller Hinton Agar, as follows: 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 9.0, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, and 14.0%.

Each antimicrobial test also included plates containing the culture medium plus ethanol, in order to obtain a control of the solvent antimicrobial effect.

After the inoculation procedures, using a multi-loop replicator, plates were incubated at 37°C/24 h and MIC endpoints were read as the lowest concentration of propolis that resulted in no visible growth or haze on the surface of the culture

medium. Populational analyses of data were carried out by calculating the MIC for 50 and 90% of the strains of each group of microorganisms tested (Fernandes et al., 1995).

2.5. Survival curve

The survival curve of Gram-positive and Gram-negative bacteria was performed in order to observe the incubation period responsible for propolis antibacterial activity. Thus, strains of *S. aureus* and *E. coli*, in a concentration of approximately 10^5 CFU/ml were inoculated in BHI plus 0.5% and 8.0% of propolis produced in each season, respectively, and corresponding to the MIC 90% obtained previously to both species.

After 1.5, 3, 6, 9 and 24 h of incubation (37°C), aliquots of each culture were removed and plated on Mueller Hinton Agar by the Pour Plate Method. Plate counts (CFU/ml) were carried out after 24 h incubation and the survival percentage was calculated (Focht et al., 1993).

2.6. Statistical analysis

Analyses of Variance was used to examine the treatment effect in the survival curve of *S. aureus* and *E. coli*, according to the incubation period in medium plus propolis obtained in each season. The probability of 0.05 was chosen as the significant level (Zar, 1984).

3. Results and discussion

Several authors have studied the antimicrobial activity of propolis (Kujumgiev et al., 1993; Castro and Higashi, 1995).

In this work, we could verify that *S. aureus* is susceptible to low propolis concentration (Table 1). Fernandes et al. (1995) also showed an efficient propolis antibacterial action on *S. aureus* strains (MIC 90% = 0.60% v/v).

On the other hand, Gram-negative bacteria growth was only inhibited in higher propolis concentrations (Table 1). The MIC 90% of propolis against *P. aeruginosa* strains was around 5.70%, while *E. coli* and *S. typhimurium* were more resistant (MIC 90% = 8.00%). These results are in agreement with those of Grange and Davey (1990), who observed a marked action of propolis against Gram-positive bacteria and limited activity against Gram-negative ones. Dobrowolski et al. (1991) and Woisky et al. (1994) also obtained similar results, supporting the hypothesis that propolis is active mainly against Gram-positive bacteria.

With regards to ethanol effects, used as a solvent for propolis in this assay, its inhibitory action was seen only in the concentration of 15.0%, far above that obtained with propolis. Thus, we may conclude that the antibacterial activity in this assay is exclusively due to propolis components.

Table 1
Susceptibility of Gram-positive and Gram-negative bacteria to ethanolic extract of propolis obtained in the four seasons^a

Microorganisms	Spring (%)	Summer (%)	Autumn (%)	Winter (%)
<i>S. aureus</i> (n = 15)				
MIC 50%	0.40	0.40	0.40	0.40
MIC 90%	0.40	0.40	0.64	0.40
<i>P. aeruginosa</i> (n = 5)				
MIC 50%	4.80	4.80	4.80	4.50
MIC 90%	5.76	5.76	5.76	5.70
<i>E. coli</i> (n = 5)				
MIC 50%	8.00	8.00	6.75	6.33
MIC 90%	8.00	8.00	7.75	7.66
<i>S. typhimurium</i> (n = 5)				
MIC 50%	8.00	8.00	6.00	6.50
MIC 90%	8.00	8.00	6.00	7.75

^a Minimal inhibitory concentration (MIC) of propolis to 50 and 90% of the strains.

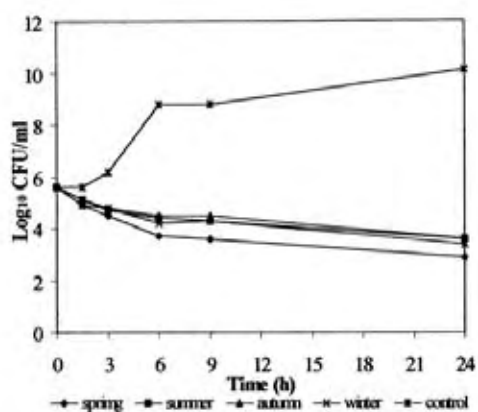


Fig. 1. Profile in time (h) of the population analysis of *S. aureus* according to the susceptibility to EEP (0.5% v/v): seasonal effect.

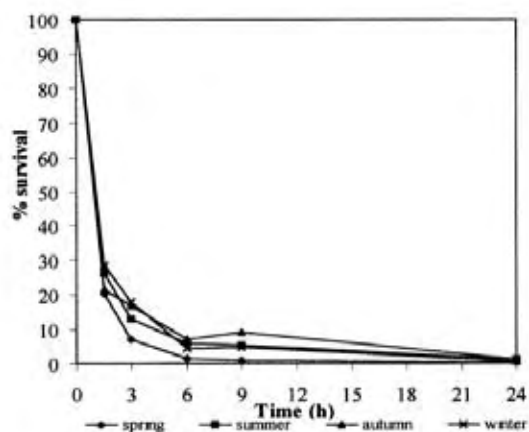


Fig. 2. Survival curve (%CFU/ml) of *S. aureus* according to the incubation period in EEP (0.5% v/v) from each season.

It can be seen (Table 2; Fig. 1) that there was a reduction in the CFU of *S. aureus* within 24 h in medium plus propolis, showing a remarkable inhibitory effect on this strain 6 h after incubation (Fig. 2). On the other hand, *E. coli* strains were susceptible to propolis (Table 3; Fig. 3), but a reduction of CFU was seen only near 24 h, presenting once more the resistance of Gram-negative bacteria to propolis (Fig. 4).

No significant differences were seen with respect to the seasonal effect in the survival curve ($P > 0.05$). A possible explanation to this new and relevant result may be the fact that this product

was obtained from the same geographical region, and perhaps differences in its chemical composition and biological activities are found between samples collected in different regions, mainly due to the local flora.

Our results showed an efficient inhibitory action due to propolis, but we cannot be assured, by this study, of a bactericidal activity, but only a bacteriostatic effect.

Since variations in the susceptibility to propolis among several microorganisms have been reported, but not their mechanisms of action, further studies are needed to explain whether the cell

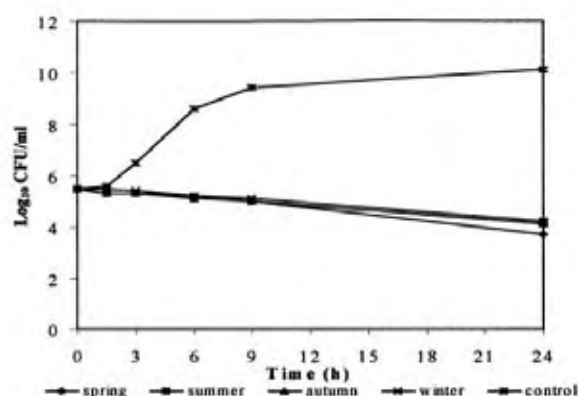


Fig. 3. Profile in time (h) of the population analysis of *E. coli* according to susceptibility to EEP (8.0% v/v): seasonal effect.

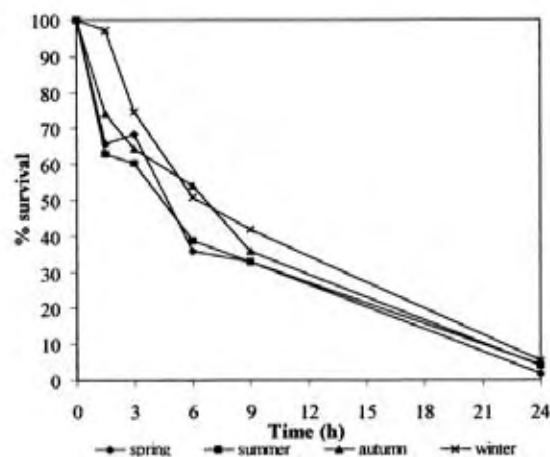


Fig. 4. Survival curve (%CFU/ml) of *E. coli* according to the incubation period in EEP (8.0% v/v) from each season.

Table 2
Population analysis of *S. aureus* according to the susceptibility to EEP (0.5% v/v)^a

Time (h)	Control		Spring		Summer		Autumn		Winter	
	CFU/ml	log	CFU/ml	log	CFU/ml	log	CFU/ml	log	CFU/ml	log
0	4.2×10^5	5.6	4.2×10^5	5.6	100.00	5.6	4.2×10^5	5.6	4.2×10^5	5.6
1.5	4.9×10^5	5.6	8.6×10^4	4.9	20.47	5.1	1.1×10^5	4.9	1.2×10^5	5.1
3	1.8×10^6	6.2	3.0×10^4	4.5	7.14	4.7	5.4×10^4	4.8	7.6×10^4	4.8
6	1.2×10^9	8.8	5.6×10^3	3.7	1.33	4.4	2.5×10^4	4.5	1.9×10^4	4.2
9	1.2×10^9	8.8	4.0×10^3	3.6	0.95	4.3	2.2×10^4	4.5	2.0×10^4	4.3
24	1.5×10^{10}	10.1	8.0×10^2	2.9	0.19	3.6	4.6×10^3	3.6	2.6×10^3	3.4

^a Viable count (CFU/ml – log₁₀) and percentages of viable bacteria in time. $F = 10.35$; $P < 0.05$.

Table 3
Population analysis of *Escherichia coli* according to the susceptibility to EEP (8.0% v/v)^a

Time (h)	Control			Spring			Summer			Autumn			Winter		
	CFU/ml	log	%	CFU/ml	log	%	CFU/ml	log	%	CFU/ml	log	%	CFU/ml	log	%
0	3.3×10^5	5.5	100.00	3.3×10^5	5.5	100.00	3.3×10^5	5.5	100.00	3.3×10^5	5.5	100.00	3.3×10^5	5.5	100.00
1.5	4.8×10^5	5.6	65.87	2.2×10^5	5.3	62.87	2.1×10^5	5.3	62.87	2.5×10^5	5.3	74.25	2.2×10^5	5.3	97.00
3	3.3×10^6	6.5	68.26	2.3×10^5	5.3	60.47	2.0×10^5	5.3	60.47	2.2×10^5	5.3	64.37	2.5×10^5	5.4	74.85
6	3.9×10^8	8.6	35.93	1.2×10^5	5.1	36.92	1.3×10^5	5.1	36.92	1.8×10^5	5.2	53.89	1.7×10^5	5.2	50.90
9	2.4×10^8	9.4	32.93	1.1×10^5	5.0	32.93	1.1×10^5	5.0	32.93	1.2×10^5	5.0	35.93	1.4×10^5	5.1	41.92
24	1.2×10^{10}	10.1	1.73	5.8×10^3	3.7	4.19	1.4×10^4	4.1	4.19	1.3×10^4	4.1	3.89	1.8×10^4	4.2	5.39

^a Viable count (CFU/ml – log₁₀) and percentages of viable bacteria in time. $F = 8.36$; $P < 0.05$.

structure and permeability to such compounds or even specific targets in the cell enzymatic systems are involved in the microbial susceptibility.

Acknowledgements

The authors thank Dr Paulo Roberto Curi for the statistical analysis, Maria Conceição Tenore do Carmo and Luiz Carlos Fioravante for technical assistance, Miss Sônia Maria Faraldo for the computer assistance, and Miss Célia Sforcin Guimarães for the text revision.

References

- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M., 1992a. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 23, 231–240.
- Amoros, M., Simões, C.M.O., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M., 1992b. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55, 1732–1740.
- Castro, S.L., Higashi, K.O., 1995. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 55–58.
- Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A.H., Dandiya, P.C., 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 77–82.
- Fernandes, A., Jr, Sugizaki, M.F., Fogo, M.L., Funari, S.R.C., Lopes, C.A.M., 1995. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animal Toxins* 1, 63–69.
- Focht, J., Hansen, S.H., Nielsen, J.V., Berg-Segers, A., Riezler, R., 1993. Bactericidal effect of propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infections. *Arzneimittel Forschung* 43, 921–923.
- Grange, J.M., Davey, R.W., 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine* 83, 159–160.
- Hernandez, N.M.R., Bernal, K.C., 1990. Efecto antibiótico del própolis frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano. *Rev. Cubana Farm.* 24, 45–50.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, U.R., Jana, W.M., Sommers, H.M., Winn, W.C., 1988. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. J.B. Lippincott, Philadelphia, 840 pp.
- Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsz, G., Czuba, Z., 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel Forschung* 43, 607–609.
- Kujumgiev, A., Bankova, V., Ignatova, A., Popov, S., 1993. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie* 48, 785–786.
- Lilenbaum, W., Barbosa, A.V., 1994. Avaliação da atividade antimicrobiana da própolis perante *Malassezia pachydermatis* 'in vitro'. *Rev. Bras. Med. Vet.* 16, 248–251.
- Marcucci, M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26, 83–99.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1985. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard M7-A. NCCLS, Villanova, PA.
- Serkedjieva, J., Manolova, N., Bankova, V., 1992. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products* 55, 294–297.
- Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., Novelli, E.L.B., 1995. Serum biochemical determinations of propolis-treated rats. *Journal of Venomous Animal Toxins* 1, 31–37.
- Tatefuji, T., Yamauchi, H., Ikeda, M., Ando, S., Kurimoto, M., 1993. Effect of propolis obtained in Brazil on infectivity of viruses. *Shoyakugaku Zasshi* 47, 60–64.
- Toth, G., 1985. Propolis: medicine or fraud? *American Bee Journal* 125, 337–338.
- Woisky, R.G., Giesbrecht, A.M., Salatino, A., 1994. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo* 30, 19–21.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*, second ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 718 pp.

Anexo 3

FERNANDES JÚNIOR, A., LEOMIL, L. FERNANDES, A.A.H., SFORCIN, J.M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. ***Journal of Venomous Animals and Toxins***, v. 7, n.2, p.173 – 182, 2001.

J. Venom. Anim. Toxins vol.7 no.2 Botucatu Dec. 2001

Pág. 173-182



[Curriculum ScienTI](#)



[How to cite this article](#)

Original paper

THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PROPOLIS PRODUCED BY *Apis mellifera* L. AND BRAZILIAN STINGLESS BEES

A. FERNANDES JR.¹ , L. LEOMIL¹, A.A.H. FERNANDES², J.M. SFORCIN¹

¹ Department of Microbiology and Immunology; ² Department of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP, State of São Paulo, Brazil.

ABSTRACT: This study investigated the antibacterial activity of propolis produced by *A. mellifera* and Brazilian stingless bees, called "meliponineos". Susceptibility tests to ethanolic extracts of propolis (EEP) were performed using bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp, and *Escherichia coli*) isolated from human infections. Dilution of EEP in agar (%v/v) was used for determination of minimal inhibitory concentration (MIC). The stingless bee species (and common names) were: *Nannotrigona testaceicornis* ("Iraí"), *Tetragonisca angustula* ("Jataí"), *Trigona spinipes* ("Arapuá"), *Scaptotrigona* sp ("Tiúba"), *Partamona* sp ("Cupira"), *Melipona scutellaris* ("Uruçu"), *Melipona* sp ("Manduri"), and *Melipona mandaçaia* ("Mandaçaia"). EEP inhibitory efficiencies according to bacterial strains were: *S. aureus* - "Cupira" > "Manduri" = *A. mellifera* > "Uruçu" > "Mandaçaia" > "Iraí" > "Tiúba" > "Jataí" > "Arapuá" = Ethanol; *Enterococcus* sp - "Cupira" > "Manduri" > *A. mellifera* > "Mandaçaia" > "Uruçu" > "Tiúba" > "Jataí" > "Arapuá" = Ethanol; *E. coli* - "Manduri" > "Jataí" > Ethanol > *A. mellifera* > "Uruçu" > "Cupira" > "Iraí". Propolis produced by "Cupira" and "Manduri" bees showed higher antibacterial activity than *A. mellifera*.

KEY WORDS: Ethanolic extract of propolis, *Apis mellifera*, Brazilian stingless bees, *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus* sp.

INTRODUCTION

Propolis is a natural resinous hive product collected by bees from buds of different trees. Bees use it as a general sealant, draught excluder, antibiotic, and embalming substances to cover carcasses from hive invaders (16).

Because of its several biological properties, understanding its chemical composition has attracted research. Even though propolis composition is mentioned in literature, new substances have been reported, such as flavonoids, which may be responsible for antibacterial, fungicidal, and anesthetic biological properties, etc. (14).

There have been studies on the geographic origin of propolis, bee species, and chemical composition (2,3,5,6,10) (11,12,14,19,20). Plants have been proposed as sources of propolis, and chemical analyses must be performed in order to confirm this (4).

There are several reports about Brazilian propolis due to its excellent quality. Japan imports about 60 tons of propolis *in natura* from Brazil annually (1).

Propolis antimicrobial activity is one of most extensively investigated biological action, and some factors may influence its inhibitory capacity (extract preparation, tested microorganisms, propolis origin, bee species, etc). Several studies related to its antimicrobial activity have been performed in our laboratories (7,8,13,21). Some authors attribute the complex composition of propolis as a reason for its antimicrobial activity, and some mechanisms of action have been proposed (15,18,22,23,24).

The antibacterial activity of propolis produced by Brazilian stingless bees was studied by Levy Jr. (1997), who reported a higher efficiency of propolis produced by *A. mellifera* against that of some stingless bees (12). Kujumgiev *et al.* (1999) reported no differences in the antibacterial, antifungal, and antiviral activities of propolis from different geographic origins, including four samples from Brazilian *A. mellifera* and two stingless bees. They also reported no inhibitory activity against *E. coli* (11).

Bankova *et al.* (1998a) identified more than 50 compounds in Brazilian stingless bees geopropolis, mainly terpenoids and phenolics (5). Some variations were seen in chemical composition according to the bee species.

This work reports the antibacterial activity of Brazilian propolis produced by *Apis mellifera* and stingless bees, by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) of propolis for bacterial strains isolated from human infections.

MATERIALS AND METHODS

Propolis

Propolis samples were collected, as follows:

Bee species	Common name	Origin
<i>Apis mellifera</i> L.	"Africanized honeybee"	São Paulo State
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	"Iraí"	São Paulo State
<i>Tetragomisca angustula</i>	"Jataí"	São Paulo State
<i>Trigona spinipes</i>	"Arapuá"	São Paulo State
<i>Scaptotrigona</i> sp	"Tiúba"	São Paulo State
<i>Melipona scutellaris</i>	"Uruçu"	Pernambuco State
<i>Melipona mandaçaia</i>	"Mandaçaia"	Pernambuco State
<i>Melipona</i> sp	"Manduri"	Pernambuco State
<i>Partamona</i> sp	"Cupira"	Pernambuco State

Ethanollic extracts of propolis (EEP)

Propolis samples were ground and ethanolic extracts were prepared, as follows:

A. mellifera, 30 g propolis/100 mL of ethanol (95%) and 7 days at room temperature for extraction and filtration; *N. testaceicornis*, two parts (weight) of propolis were mixed with one volume of ethanol 95%. After 24 hours, the mixture was filtered and the liquid portion was centrifuged at 400 xg for 20 minutes and stored in amber glass at -10°C (12); *Melipona* sp, *M. scutellaris*, *M. mandaçaia*, and *Partamona* sp, 100 g propolis/100 mL of ethanol 95% and 2 days at room temperature for extraction and filtration (9); *T. spinipes*, *T. angustula*, and *Scaptotrigona* sp, the same methodology as for *A. mellifera*.

The final concentration (dry matter) (mg/mL) of each extract was: "Uruçu" (49.5), "Manduri" (57.2), "Cupira" (46.0), "Mandaçaia" (16.0), "Tiúba" (121.0), "Arapuá" (74.0), "Iraí" (insufficient volume for determination), "Jataí" (110.0), and *A. mellifera* (128.0). These values were obtained by ethanol evaporation placing EEP aliquots at 50°C/48 h.

Bacterial strains and susceptibility tests

Ninety-one bacterial strains isolated from human infections were tested: *Staphylococcus aureus* (n=30), *Enterococcus* sp (n=30), and *Escherichia coli* (n=31). After isolation and identification, the strains were kept in nutrient agar.

Determination of minimal inhibitory concentration was performed for 90% of the strains (MIC 90%) by the agar dilution method, following the National Committee of Clinical Laboratory Standard Guidelines (17).

Serial EEP concentrations were made (%v/v) in Petri dishes containing Mueller Hinton Agar to *S. aureus* and *E. coli* and Brain Heart Infusion to *Enterococcus* sp. Concentrations were obtained in previous assays for each EEP and bacterial species, ranging from 0.2 to 11% for

"Cupira" and "Irai" and from 0.2 to 13% for the remaining bees species. Control plates with ethanol were prepared in order to obtain a control of the solvent antimicrobial effect. Ethanol concentrations ranged from 5 to 12%.

The agar was allowed to solidify, and a standard number of test bacteria (approximately 10^5 colony forming units (CFU)/mL), obtained from suspensions adjusted to 0.5 Mac Farland Standard, were spot inoculated onto each plate using a multipoint inoculator (Steer's replicator) with a capacity of 32 different isolates. The MIC was defined as the lowest concentration of propolis that resulted in no bacterial growth after incubation at 37°C for 24 h. MIC 90% values were also estimated in mg/mL (Table 1).

Table 1. Antibacterial activity (MIC 90% in %v/v and mg/mL) of propolis produced by *A. mellifera* and stingless bees against *S. aureus*, *Enterococcus* sp, and *E. coli*.

Microorganisms	"Uruçu"	"Manduri"	"Cupira"	"Mandaçaia"	"Irai"	"Tiúba"	"Jataí"	"Arapuá"	<i>Apis mellifera</i>	Ethanol
<i>S. aureus</i> (n = 30)										
MIC 90%(%v/v)	0.48	0.3	0.3	1.0	3.88	6.8	9.0	12.8	0.3	>12.0
MIC 90%(mg/mL)	0.23	0.17	0.14	0.16	-	8.23	9.9	9.47	0.38	-
Range(%v/v)	0.3-0.5	0.3-0.5	0.2-0.6	1.0-2.0	2.5-4.0	4.0-7.0	9.0-	11.0-13.0	0.2-0.7	-
<i>Enterococcus</i> sp (n = 30)										
MIC 90%(%v/v)	4.8	0.94	0.5	1.9	-	9.2	10.0	13.0	1.14	>12.0
MIC 90%(mg/mL)	2.37	0.53	0.23	0.30	-	11.13	11.0	9.62	1.46	-
Range(%v/v)	1.0-5.0	0.5-1.0	0.5-	1.0-2.0	-	7.0-9.5	10.0-	13.0-	0.8-1.2	-
<i>E. coli</i> (n = 31)										
MIC 90%(%v/v)	10.77	7.32	11.0	-	>11.0	-	8.9	-	9.42	9.0
MIC 90%(mg/mL)	5.33	4.18	5.06	-	-	-	9.8	-	12.05	-
Range (%v/v)	7.0-11.0	5.0-7.5	8.0->11.0	-	>11.0-	-	7.5-9.0	-	8.0-9.5	-

Statistical analysis

Results were analyzed using the non-parametric test of Kruskal-Wallis for independent samples and/or treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

MIC 90% values for bacterial strains are summarized in Table 1.

There were significant differences in MIC 90% values between stingless bee species. All propolis samples from the Northeast of Brazil (Pernambuco State) ("Uruçu", "Manduri", "Cupira", and "Mandaçaia") were more effective than the samples obtained in the Southeast (São Paulo State)

("Iraí", "Jataí", "Tiúba", and "Arapuá") against *S. aureus* strains. It is important to note that the propolis produced by the "Arapuá" bee gave MIC 90% values similar to those obtained with ethanol, and showing no activity against *S. aureus*. Similar results were obtained with propolis produced by the stingless bees ("Cupira", "Manduri", and "Uruçu") and *A. mellifera*.

The propolis from "Cupira" and "Manduri" bees were again the most effective against *Enterococcus* sp, with "Arapuá" being the least effective. The propolis from the "Uruçu" bee gave very different MIC 90% values for Gram-positive bacteria: 0.48% for *S. aureus* and 4.8% for *Enterococcus* sp.

It is interesting to note that all the propolis had higher MIC values against *E. coli* than against the *S. aureus* and *Enterococcus* sp strains. The propolis from the "Manduri" bee was the most effective, and that from the "Iraí" was the least effective of the stingless bee samples. Thus, one may conclude that propolis action against Gram-negative bacteria, independent of bee species, is strongly attributable to the solvent used (ethanol). This is based on the observation that the MIC 90% of ethanol for *E. coli* (9.0%v/v) was lower than MIC 90% values for "Uruçu", "Iraí", "Cupira", and *A. mellifera*. Similar results have been reported (11).

According to the statistical analysis and concentration in %v/v, the order of propolis activity was for: *S. aureus* - "Cupira" > "Manduri" = *A. mellifera* > "Uruçu" > "Mandaçaia" > "Iraí" > "Tiúba" > "Jataí" > "Arapuá" = Ethanol; *Enterococcus* sp - "Cupira" > "Manduri" > *A. mellifera* > "Mandaçaia" > "Uruçu" > "Tiúba" > "Jataí" > "Arapuá" = Ethanol; and *E. coli* - "Manduri" > "Jataí" > Ethanol > *A. mellifera* > "Uruçu" > "Cupira" > "Iraí".

Although chemical analysis of EEP was not performed, propolis composition should certainly differ between these samples and be responsible for their different antibacterial activity. This statement is supported by Bankova *et al.* (1998a), who reported differences in propolis chemical composition produced by three species of Brazilian stingless bees (4). Therefore, new studies on the chemical composition of EEP would be important for a better understanding of this issue.

It is also possible to report that the extract preparation may also influence these results, although all of them were ethanolic extracts. Further investigations should be performed using a single methodology to prepare the EEP for all bee species studied here, as in this paper there were differences in EEP preparation.

According to the results, it may be concluded that, in general, Gram-positive bacteria were more susceptible to EEP antibacterial action than Gram-negative bacteria. Propolis showed a different antibacterial activity by the bee species.

REFERENCES

- 01 ABREU, J.A.S. Comercialização de própolis. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA*, 11, Teresina, 1996. *Resumos e Palestras...* Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996: 203.
- 02 AGA H., SHIBUYA T., SUGIMOTO T., KURIMOTO M., NAKAJIMA S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994, 58, 945-6.

- 03 BANKOVA V., BOUDOUROVA-KRASTEVA G., POPOV S., SFORCIN JM., FUNARI SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 1998, 29, 361-7.
- 04 BANKOVA V., BOUDOUROVA-KRASTEVA G., SFORCIN JM., FRETE X., KUJUMGIEV A., RODELLA RM., POPOV S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1999, 54, 401-5.
- 05 BANKOVA V., CHRISTOV R., MARCUCCI C, POPOV S. Constituents of Brazilian geopropolis. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1998, 53, 402-6.
- 06 BOUDOUROVA-KRASTEVA G., BANKOVA V., SFORCIN JM., NIKOLOVA N., POPOV S. Phenolic from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1997, 52, 676-9.
- 07 FERNANDES JR A., LOPES CAM., SFORCIN JM., FUNARI SRC. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Venom. Anim. Toxins*, 1997, 3, 287-94.
 [[Lilacs](#)] [[SciELO](#)]
- 08 FERNANDES JR A., SUGIZAKI M.F., FOGO ML., FUNARI SRC., LOPES CAM. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins*, 1995, 1, 63-9.
 [[Lilacs](#)] [[SciELO](#)]
- 09 KERR WE. Abelhas indígenas brasileiras (meloponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. *Inf. Agropec. (Belo Horizonte)*, 1987, 13, 15-22.
- 10 KOO MH., PARK YK. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61, 367-9.
- 11 KUJUMGIEV A., TSVETKOVA I., SERKEDJIEVA Y., BANKOVA V., CHRISTOV R., POPOV S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.*, 1999, 64, 235-40.
- 12 LEVY JR NC. *Estudo da atividade antimicrobiana de méis e própolis de Apis mellifera e Meliponinae brasileiros*. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 1997. 116p. (Dissertação - Mestrado).
- 13 LOPES MMR. *Atividade antimicrobiana da própolis frente a linhagens bacterianas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli em função do local de coleta*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 1997. 68p. (Monografia em Ciências Biológicas).
- 14 MARCUCCI MC., BANKOVA VS., FERRERES F., ZAGO EB., DE CASTRO SL. Avanços recentes na investigação química e biológica de própolis brasileiras. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA**, 11, Teresina, 1996. **Resumos e Palestras...** Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996: 205-8.
- 15 MIRZOEVA OK., GRISHANIN RN., CALDER PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.*, 1997, 152, 239-46.

- 02 AGA H., SHIBUYA T., SUGIMOTO T., KURIMOTO M., NAKAJIMA S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1994, 58, 945-6. [[Links](#)]
- 03 BANKOVA V., BOUDOUROVA-KRASTEVA G., POPOV S., SFORCIN JM., FUNARI SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 1998, 29, 361-7. [[Links](#)]
- 04 BANKOVA V., BOUDOUROVA-KRASTEVA G., SFORCIN JM., FRETE X., KUJUMGIEV A., RODELLA RM., POPOV S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1999, 54, 401-5. [[Links](#)]
- 05 BANKOVA V., CHRISTOV R., MARCUCCI C., POPOV S. Constituents of Brazilian geopropolis. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1998, 53, 402-6. [[Links](#)]
- 06 BOUDOUROVA-KRASTEVA G., BANKOVA V., SFORCIN JM., NIKOLOVA N., POPOV S. Phenolic from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1997, 52, 676-9. [[Links](#)]
- 07 FERNANDES JR A., LOPES CAM., SFORCIN JM., FUNARI SRC. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Venom. Anim. Toxins*, 1997, 3, 287-94. [[Links](#)]
- 08 FERNANDES JR A., SUGIZAKI M.F., FOGO ML., FUNARI SRC., LOPES CAM. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins*, 1995, 1, 63-9. [[Links](#)]
- 09 KERR WE. Abelhas indígenas brasileiras (meloponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. *Inf. Agropec. (Belo Horizonte)*, 1987, 13, 15-22. [[Links](#)]
- 10 KOO MH., PARK YK. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61, 367-9. [[Links](#)]
- 11 KUJUMGIEV A., TSVETKOVA I., SERKEDJIEVA Y., BANKOVA V., CHRISTOV R., POPOV S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.*, 1999, 64, 235-40. [[Links](#)]
- 12 LEVY JR NC. *Estudo da atividade antimicrobiana de méis e própolis de Apis mellifera e Meliponinae brasileiros*. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 1997. 116p. (Dissertação - Mestrado). [[Links](#)]
- 13 LOPES MMR. *Atividade antimicrobiana da própolis frente a linhagens bacterianas de Staphylococcus aureus e Escherichia coli em função do local de coleta*. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 1997. 68p. (Monografia em Ciências Biológicas). [[Links](#)]

- 16 MORENO MIN., ISLA MI., CUDMANI NG., VATTUONE, MA., SAMPIETRO AR. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.*, 1999, 68, 97-102.
- 17 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically*. Villanova, Pa.: 1997. (Approved Standard M7-A).
- 18 PARK YK., KOO MH., ABREU JAS, IKEGAKI M., CURY JA., ROSALEN PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr. Microbiol.*, 1998, 36, 24-8.
- 19 PARK YK., KOO MH., IKEGAKI M., CONTADO JL. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Tecnol. (Curitiba)*, 1997, 40, 97-106.
- 20 SERRA-BONVEHI J., VENTURA-COLL F. Phenolic composition of propolis from China and from South America. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1994, 49, 712-8.
- 21 SFORCIN JM., FERNANDES JR A, LOPES CAM., FUNARI SR. Efeito da sazonalidade sobre a atividade antibacteriana da própolis. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA**, 11, Teresina, 1996. **Resumos e Palestras...** Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996: 389.
- 22 SIMUTH J., TRNOVSKY J., JELOKOVÁ J. Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonuclease by UV- absorbing components from propolis. *Pharmazie*, 1986, 41, 131-2.
- [[Medline](#)]
- 23 STREHL E., VOLPERT R., ELSTNER EF. Biochemical activities of propolis-extracts. III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.*, 1994, 49, 39-43.
- 24 TAKAISI-KIKUNI NB., SCHILCHER H. Electron microscopic and microcolorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of the defined propolis provenance. *Planta Méd.*, 1994, 60, 222-7.

Received 19 July 2000

Accepted 29 August 2000

 **CORRESPONDENCE TO:**

A. FERNANDES JR. - Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, CEP 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil.

E-mail: ary@ibb.unesp.br

Anexo 4

FERNANDES JÚNIOR, A., BALESTRIN, E.C., BETONI, J.E.C., ORSI, R. O., CUNHA, M.L.R.S., MONTELLI, A.C. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and with antimicrobial drugs. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, v. 100, n. 5, p.563-566, 2005.

Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs

Ary Fernandes Júnior⁺, Elaine Cristina Balestrin, Joyce Elaine Cristina Betoni, Ricardo de Oliveira Orsi, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, Augusto Cezar Montelli

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Unesp, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil

Propolis is a natural resinous substance collected by bees from tree exudates and secretions. Its antimicrobial activity has been investigated and inhibitory action on Staphylococcus aureus growth was evaluated. The in vitro synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and antimicrobial drugs by two susceptibility tests (Kirby and Bauer and E-Test) on 25 S. aureus strains was evaluated. Petri dishes with sub-inhibitory concentrations of EEP were incubated with 13 drugs using Kirby and Bauer method and synergism between EEP and five drugs [chloramphenicol (CLO), gentamicin (GEN), netilmicin (NET), tetracycline (TET), and vancomycin (VAN)] was observed. Nine drugs were assayed by the E-test method and five of them exhibited a synergism [CLO, GEN, NET, TET, and clindamycin (CLI)]. The results demonstrated the synergism between EEP and antimicrobial drugs, especially those agents that interfere on bacterial protein synthesis.

Key words: propolis - *Staphylococcus aureus* - Kirby and Bauer method - E-test method - antimicrobial drugs

Propolis is a complex resinous material produced by honeybees from plant exudates, beeswax, and bee secretions (Kusumoto et al. 2001) and is responsible for safety of honeycombs, especially against microorganisms (Bosio et al. 2000). The chemical composition of *Apis mellifera* propolis and its wide spectrum of biological activities (hepatoprotective, antitumour, antioxidative, antimicrobial, and antiinflammatory properties) have attracted the attention of researchers (Banskota et al. 2001). It is composed of 50% resin and vegetable balsam, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen, and 5% several substances, including organic debris, but this composition varies according to the vegetal source (Burdock 1998). The mechanism of antimicrobial activity of propolis is complex and could be attributed to the synergistic activity between phenolic and other compounds (Krol et al. 1993) mainly to the flavonoids pinocembrin, galangin, and pinobanksin (Castaldo & Capasso 2002). A stronger activity was observed on gram-positive bacteria growth (Burdock 1998). The antimicrobial activity was observed on *Staphylococcus aureus* (Krol et al. 1993, Fernandes Júnior et al. 1995, 1997, 2001, 2003, Sforcin et al. 2000), *Streptococcus pyogenes* (Bosio et al. 2000), gram-positive and gram-negative bacteria species and *Candida* (Drago et al. 2000, Sforcin et al. 2000, Stepanovic et al. 2003), *Streptococcus mutans* (Koo et al. 2002), anaerobic bacteria of human oral cavity (Santos et al. 2002), *Salmonella* (Orsi et al. 2005), and on miscellaneous microorganisms including *Mycobacterium* (Banskota et al. 2001). Antibacterial activity of propolis on *S. aureus* growth was higher when

ethanolic extracts were prepared with 60 to 80% ethanol solutions (Fernandes Júnior et al. 2003). In vitro synergism between propolis and antimicrobial drugs has been investigated (Kedzia & Holderna 1986, Detoma & Ozino 1991, Krol et al. 1993, Scheller et al. 1999, Stepanovic et al. 2003) and preparations of propolis with antibiotics and antifungals are of potential medical interest (Stepanovic et al. 2003).

Antimicrobial susceptibility methods used in clinical laboratories are based on the principle of diffusion, known as the Kirby and Bauer test (disk diffusion) and E-test (strip diffusion). The E-test method is based on a combination of concepts of both dilution and diffusion tests. The drugs are impregnated in a strip an antimicrobial density gradient is established in an agar plate and minimal inhibitory concentration (MIC) in mg/ml are evaluated (Mahon & Manuselis 1995). The aim of the present work was to investigate in vitro synergism between propolis ethanolic extract (EEP) and anti-*S. aureus* drugs performed by Kirby and Bauer and E-test methods.

MATERIALS AND METHODS

Ethanolic extract of propolis (EEP) - A crude sample of *Apis mellifera* propolis was collected from apiary in Botucatu School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, Unesp, São Paulo State University, Brazil. EEP was obtained diluting 25 g crude propolis in 100 ml of 70% ethanol, and extracted at room temperature. After three days the extract was filtered (Whatman paper) and kept at refrigerator temperature.

S. aureus strains - Sixty-one *S. aureus* strains were isolated from clinical specimens of newborns admitted to the Neonatal Unit of the University Teaching Hospital, Botucatu, state of São Paulo, Brazil. Strains were isolated in Sheep's blood agar and after identification (Koneman et al. 1997) were stored in brain heart infusion (BHI) plus agar.

Financial support: Fapesp

⁺Corresponding author. Email: ary@ibb.unesp.br

Received 7 April 2005

Accepted 20 July 2005

564 Propolis: anti-*S. aureus* activity • Ary Fernandes Júnior et al.

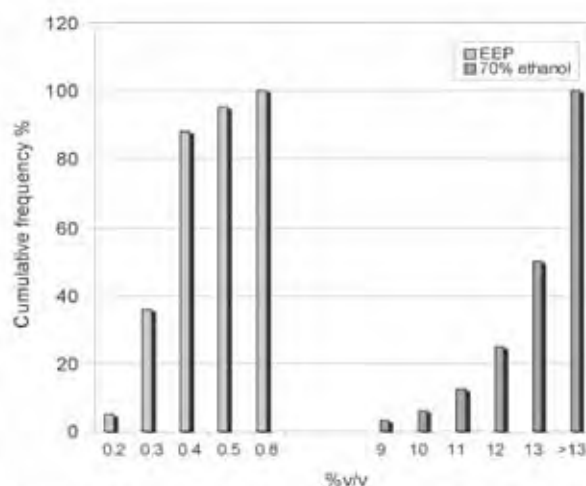
Minimal inhibitory concentration (MIC) of propolis - Concentration (MIC) of EEP was determined for 61 *S. aureus* strains by diluting the extract in Mueller-Hinton Agar (MHA) media (% volume/volume), as recommended (NCCLS 2002). Petri plates containing concentrations of EEP varying from 0.2 to 13% v/v, control plates without EEP and 70% ethanol control were inoculated with *S. aureus* strains (10^5 CFU) using a Steers replicator, and incubated at 37°C/24 h. The concentration, that inhibited visible growth of each strain (MIC), was recorded and the MIC 90% was calculated.

Synergism assays between EEP and other antimicrobial drugs - In vitro synergism assays were carried out after evaluating the EEP MIC. One-fourth of MIC 90% was considered as sub-inhibitory concentration of EEP in the synergism assays (Mahon & Manuselis 1995). Synergism assays were carried out on 25 *S. aureus* strains, including one ATCC 13565, according two diffusion methods (Kirby and Bauer and E-test) on Mueller-Hinton agar (MHA). Thirteen drugs were evaluated by disk diffusion method: penicillin 10 UI (PEN), oxacillin 1 mg (OXA), vancomycin 30 mg (VAN), ampicillin 10 mg (AMP), cephalothin 30 mg (CFL), cefoxitin 30 mg (CFO), chloramphenicol 30 mg (CLO), gentamicin 10 mg (GEN), netilmicin 30 mg (NET), tetracycline 30 mg (TET), erythromycin 15 mg (ERI), cotrimoxazol 25 mg (SUT), and ofloxacin 5 mg (OFX). Two antibiogram sets in duplicate were performed for each *S. aureus* strains in control plates with plain MHA and in plates containing MHA plus one-fourth of MIC 90% of EEP. On Kirby and Bauer method (NCCLS 2002), diameters (millimeter) of inhibitory zones were recorded after incubation at 37°C/18 h. In addition to OXA, VAN, CFL, CLO, GEN, NET, and TET, evaluated by disk diffusion, two other drugs, clindamycin (CLI) and rifampicin (RIF) were also evaluated by the E-test method. The antibacterial activity ($\mu\text{g/ml}$) was recorded by observing the elliptical inhibitory areas for each strip (Mahon & Manuselis 1995) after incubation at 37°C/18 h.

Statistical analysis - Results from synergism assays were submitted to the Mann-Whitney non-parametric test comparing the values (mm) of the inhibitory zone in the disk diffusion method and the values of the MIC ($\mu\text{g/ml}$) from the E-test method (Minitab Statistical Software version 13.32). Results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

MIC 90% of EEP and 70% ethanol control are shown in Figure. The EEP showed a MIC 90% of 0.4% v/v and the 70% ethanol control was higher than 13% v/v. These values were similar to those reported by Fernandes Júnior et al. (1995, 1997, 2001) and Sforzin et al. (2000). The antibacterial activity of EEP when compared to 70% ethanol control shows that substance combinations were responsible for the action of propolis and not the ethanol in the EEP. Although the properties of propolis have been the subject of several investigations, it is difficult to compare the results of different studies, due to the different compositions and/or different methods used for the evaluation of propolis antibacterial activities.



Cumulative frequency of inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by ethanolic extract of propolis and 70% ethanol control (EEP MIC 90% = 0.40% v/v and 70% ethanol control MIC 90% > 13%v/v).

The results of in vitro synergism from the Kirby and Bauer and E-test method are presented in Tables I and II, respectively. Kirby and Bauer and E-test methods revealed synergism between EEP with five drugs (CLO, GEN, NET, TET, VAN, and CLO, GEN, NET, TET, CLI respectively). The synergism with drugs that inhibit protein synthesis (CLO, GEN, NET, TET, CLI) and absence of antagonism between the EEP and all drugs tested are important observations of present study and, to the best of our knowledge is being shown by E-test method for the first time. These results were identical for Kirby and Bauer and E-test methods and, although the E-test method shows MIC ($\mu\text{g/ml}$) values for each drug, the disk diffusion method could be employed in studies with similar objectives because it is more economic. Results similar to ours were reported previously by disk diffusion method (Kedzia & Holderna 1986, Detoma & Ozino 1991, Krol et al. 1993, Scheller et al. 1999, Stepanovic et al. 2003).

Some mechanisms of the activity of propolis on bacterial growth have been reported: (1) inhibition of cell division; (2) bacterial cytoplasm, cell membranes, and cell walls collapse; (3) bacteriolysis; and (4) protein synthesis inhibition (Takaisi-Kikumi & Schilcher 1994). Galagin and caffeic acid from EEP are enzymatic inhibition agents in bacteria (Havsteen 1983, Ikeno et al. 1991, Koo et al. 2002). The RNA-polymerase inhibition by propolis compounds was verified (Takaisi-Kikumi & Schilcher 1994) and can explain partially the synergism of EEP with drugs that act by inhibiting protein synthesis observed here. However, we consider these as preliminary results and the establishment of the molecular basis of synergistic effect between EEP and drugs with action is on bacteria protein synthesis is necessary.

Thus, the results presented in the present report were encouraging although clinical controlled studies are needed to define the real efficacy. These studies could

TABLE I
Inhibitory effect of antimicrobial agents on 25 *Staphylococcus aureus* isolates during exposure to ethanolic extract of propolis (EEP), evaluated by Kirby and Bauer method

Antimicrobial agent	Zone diameter in mm: median (range)		p ^a
	MHA without EEP	MHA with EEP	
Chloramphenicol	27.5 (10-31)	29.0 (10-35)	0.031
Gentamicin	24.0 (0-28)	26.0 (0-31)	0.007
Netilmicin	26.0 (13-30)	29.5 (17-36)	0.001
Tetracycline	24.0 (8-27)	27.5 (9-35)	0.005
Vancomycin	20.5 (19-23)	22.0 (19-24)	0.017
Cotrimoxazol	32.0 (0-35)	33.0 (0-39)	0.088
Ofloxacin	28.5 (10-33)	29.0 (9-32)	0.397
Cephalothin	34.5 (8-44)	37.0 (9-43)	0.441
Ampicillin	22.0 (9-45)	25.0 (10-45)	0.392
Penicillin	23.0 (9-48)	25.5 (9-48)	0.382
Cefoxitin	29.0 (0-33)	30.5 (0-33)	0.210
Erythromycin	23.5 (0-27)	24.5 (0-34)	0.350
Oxacillin	26.5 (0-30)	26.0 (0-30)	0.447

MHA: Mueller Hinton Agar; a: significant difference when p values < 0.05

TABLE II
Inhibitory effect of antimicrobial agents on 25 *Staphylococcus aureus* isolates during exposure to ethanolic extract of propolis (EEP), evaluated by minimal inhibitory concentration (MIC) determination

Antimicrobial agent	MIC ^a µg/ml: median (range)		p ^b
	MHA without EEP	MHA with EEP	
Chloramphenicol	3.0 (2-192)	2.0 (1-96)	0.023
Gentamicin	0.75 (0.023-256)	0.19 (0.047-256)	<0.001
Netilmicin	0.75 (0.5-24)	0.25 (0.047-12)	<0.001
Tetracycline	1.5 (0.75-64)	0.38 (0.094-32)	<0.001
Clindamycin	0.094 (0.064-256)	0.047 (0.023-256)	<0.001
Vancomycin	1.5 (1-2)	1.5 (0.75-2)	0.312
Oxacillin	0.25 (0.094-256)	0.19 (0.125-256)	0.684
Cephalothin	0.19 (0.094-256)	0.19 (0.094-64)	0.676
Rifampicin	0.016 (0.016-20)	0.016 (0.016-10)	0.984

MHA: Mueller Hinton Agar; a: E-test method; b: significant difference when p values < 0.05

determine the potential medical use of propolis in combination with certain antimicrobial drugs on staphylococci diseases. Since bacteria may be resistant to several antimicrobial drugs, the synergism reported here is of relevance and propolis may constitute an alternative for treating these pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

To Luciano Barbosa (Departamento de Matemática e Bioestatística/ IBB/UNESP/Botucatu) for statistical analysis.

REFERENCES

- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 15: 561-571.
- Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozimo O, Savoia D 2000. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol* 31: 174-177.
- Burdock GA 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol* 36: 347-363.
- Castaldo S, Capasso F 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73 (Suppl. 1): S1-S6.
- Detoma P, Ozino OL 1991. Azione della propoli su microrganismi dell'ambiente ospedalino. *Ann Microbiol Enzimol* 41: 231-236.
- Drago I, Mombelli B, De Vecchi E, Fassina MC, Tocalli L, Gismondo MR 2002. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J Chemotherapy* 12: 390-395.
- Fernandes Júnior A, Balestrin ECC, Cunha MLRS 2003. Anti-*Staphylococcus aureus* activity of bee propolis extracts prepared with different ethanol concentrations. *Rev Ciênc Farm* 24: 147-152.
- Fernandes Júnior A, Leomil L, Fernandes AAH, Sforcin JM 2001. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J Venom Anim Toxins* 7: 173-182.
- Fernandes Júnior A, Lopes CAM, Sforcin JM, Funari SRC 1997. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Venom Anim Toxins* 3: 287-294.

566 Propolis: anti-*S. aureus* activity • Ary Fernandes Junior et al.

- Fernandes Júnior A, Sugizaki MF, Fogo ML, Fumari SRC, Lopes CAM 1995. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J Venom Anim Toxins* 1: 63-69.
- Havsteen B 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacology potency. *Biochem Pharmacol* 32: 1141-1148.
- Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C 1991. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* 25: 347-351.
- Kedzia B, Holderna E 1986. Investigations upon the combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus*. *Herba Polonica* 32: 187-195.
- Koneman EW, Allen SD, Janda NM, Sshrechkenberger PC, Winn JR 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th ed., JB Lippincott, Philadelphia, 1395 pp.
- Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1302-1309.
- Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-forsch* 43: 607-609.
- Kusumoto T, Miyamoto RH, Doi S, Hiroyuki S, Yamada H 2001. Isolation and structures of two new compounds from the essential of Brazilian propolis. *Chem Pharm Bull* 49: 1207-1209.
- Mahon CR, Mansel JR G 1995. *Textbook of Diagnostic Microbiology*, WB Saunders, Philadelphia, 1134 pp.
- NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, document M100-S12, Pennsylvania.
- Orsi RO, Sforcin JM, Rall VLM, Funari SRC, Barbosa L, Fernandes Júnior A 2005. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 11: 109-116.
- Santos FA, Bastos EMA, Uzeda B, Carvalho MAR, Farias ESA, Braga FC 2002. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 80: 1-7.
- Scheller S, Dworniczak S, Waldemar KK, Rajca M, Tomczik A, Shani J 1999. Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Z Naturforsch C* 54: 549-553.
- Sforcin JM, Fernandes Júnior A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 73: 243-249.
- Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic M 2003. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 158: 353-357.
- Takaisi-Kikumi NB, Schilcher H 1994. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica* 60: 222-227.

Anexo 5

MANTOVANI R.P., RALL V.L.M., BATALHA J.E.N., FERNANDES A.A.H., **FERNANDES JÚNIOR, A.** Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of propolis from two brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by the e-test method. ***Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease***. v. 14, n. 02, p. 357-365, 2008.

Received: November 1, 2007
Accepted: January 4, 2008
Abstract published online: January 31, 2008
Full paper published online: May 31, 2008

J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.
V.14, n.2, p.357-365, 2008.
Original paper.
ISSN 1678-9199.

ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD

MANTOVANI R. P. (1), RALL V. L. M. (1), BATALHA J. E. N. (1), FERNANDES A. A. H. (2), FERNANDES JUNIOR A. (1)

(1) Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Institute of Biosciences, IBB, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil; (2) Department of Chemistry and Biochemistry, IBB, UNESP, Botucatu, São Paulo State, Brazil.

ABSTRACT: Propolis is a natural resinous substance collected by bees from vegetal sources and its therapeutic properties have been investigated. In this work, we evaluated the inhibitory activity of ethanolic extracts of propolis (EEP) from the Southeast and South of Brazil on coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) growth as well as the EEP *in vitro* synergism with antimicrobial drugs by using the diffusion method (E-test). The EEP chemical characteristics (dry weight, pH, flavonoid and phenolic compounds) were determined. Seven drugs were tested, and synergism was observed between three drugs and Southeast EEP, six drugs and South EEP, and one drug and ethanol control. Ethanolic extracts of propolis from the South of Brazil presented the greatest flavonoid content and synergism rate, while EEP from the Southeast presented the greatest anti-CNS activity and phenolic compound content. Results showed the correlation among anti-CNS activity, synergism rate and chemical characteristics of propolis.

KEY WORDS: Brazilian propolis, coagulase-negative *Staphylococcus*, E-test, antimicrobial drugs, synergism.

CONFLICTS OF INTEREST: There is no conflict.

CORRESPONDENCE TO:

ARY FERNANDES JUNIOR, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, SP, Brasil, Phone: +55 14 3811 6058. Fax: +55 14 3815 3744. Email: ary@ibb.unesp.br.

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 358

INTRODUCTION

Propolis is a complex resinous material produced by honeybees from plant exudates, beeswax, and bee secretions (17) and has protective function on honeycombs, especially against microorganisms (3). The chemical composition of *Apis mellifera* propolis and its wide spectrum of biological activities (hepatoprotective, antitumour, antioxidative, antimicrobial, and anti-inflammatory properties) have attracted the attention of researchers (2). It is composed of 50% resin and vegetable balsam, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen, and 5% several substances, including organic debris; but this composition varies according to the vegetal source (4). In the last few years propolis from tropical regions, especially from Brazil, has become a subject of increasing interest, and investigations revealed that flavonoids are important components of these samples (1).

The antimicrobial mechanism of propolis is complex and could be attributed to the synergistic activity between phenolic and other compounds (16), mainly to the flavonoids pinocembrin, galangin, and pinobanksin (5). Also, several mechanisms of the activity of propolis on bacterial growth have been reported: (1) inhibition of cell division; (2) bacterial cytoplasm, cell membranes, and cell walls collapse; (3) bacteriolysis; and (4) protein synthesis inhibition (27). Galagin and caffeic acid from EEP are enzyme inhibitors of the bacterial metabolism (11, 12, 15).

A stronger activity on Gram-positive bacteria growth has been reported (4) and a correlation between this activity and flavonoids content were related (10). Antimicrobial activity was observed against *Staphylococcus aureus* (8, 16, 25), *Streptococcus pyogenes* and *S. mutans* (3, 15), Gram-positive and Gram-negative bacteria species and *Candida* (7, 25, 26), anaerobic bacteria of human oral cavity (23), *Salmonella* (21,22) and on miscellaneous microorganisms including *Mycobacterium* (2).

In vitro synergism between propolis and antimicrobial drugs has been investigated (6, 8, 13, 16, 21, 24, 26) and the protein synthesis inhibitors in bacterial metabolism showed the greatest synergism rate with ethanolic extract of propolis (8).

Antimicrobial susceptibility methods in clinical laboratories utilize the principle of diffusion, known as the Kirby and Bauer (disk diffusion) and E- test (strip diffusion) methods. The E-test method uses the combination of both principles – dilution and diffusion. Drugs are impregnated in a strip, an antimicrobial density gradient is

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 359

established in an agar plate, and the minimal inhibitory concentration (MIC), in mg/ml, is evaluated (18).

Staphylococci species are initially differentiated by the coagulase test. The following coagulase-producing *Staphylococcus* are *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, and some strains of *S. hyicus* and *S. schleiferi*. Staphylococci that do not produce coagulase are referred to as coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS). The most clinically significant species in this group are *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* which have been known to be responsible for a variety of hospital-acquired infections and to be associated with urinary tract infections (18).

The aim of the present work was to investigate *in vitro* synergism between two ethanolic extracts of Brazilian propolis (EEP) and seven drugs employed against CNS strains using the susceptibility test denominated E-test method.

MATERIALS AND METHODS

Ethanolic Extract of Propolis (EEP)

A crude sample of *Apis mellifera* propolis was collected from Botucatu, São Paulo State, Southeast of Brazil (latitude 22°53'09" south, longitude 48°26'42" west) and Uribici, Santa Catarina State, South of Brazil (latitude 28°00'48" south, longitude 49°35'22" west); EEP were obtained treating 25g crude propolis in 100ml of 70% ethanol, and extracted at room temperature. After three days, the extract was filtered (Whatman paper) and stored at 5°C. Some physicochemical characteristics of EEP (dry weight, pH, phenolic and flavonoid content) were measured according to the methodology of Gonsales *et al.* (10).

Coagulase-Negative *Staphylococcus* (CNS) Strains

Thirty-two CNS strains were isolated from clinical specimens of newborns admitted to the Neonatal Unit of the University Teaching Hospital, Botucatu, São Paulo State, Brazil. Strains were isolated in Sheep's Blood Agar and after biochemical identification (14) they were stored in brain heart infusion (BHI) plus agar. The strains tested were *S. haemolyticus* (n=6), *S. warneri* (n=4), *S. epidermidis* (n=13), *S. lugdunensis* (n=3), *S. xylois* (n=2), *S. hominis* (n=2) and *S. cohnii* (n=2).

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 360

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of EEP

MIC of EEPs were carried out for 32 CNS strains by diluting the extracts in Mueller-Hinton Agar (MHA) media (%v/v), as recommended by the CLSI/NCCLS (19,20). Petri plates containing EEP concentrations varying from 0.1 to 5.0%v/v and control plates with MHA and MHA plus 70% ethanol were inoculated with CNS strains (10^5 CFU) using a Steers replicator and were incubated at 37°C/24h. The MIC was determined as the lowest concentration of EEP that inhibited the growth of CNS strains, and the MIC 90% was calculated for two EEP and ethanol 70% control.

Synergism Assays between EEP and Antimicrobial Drugs

In vitro synergism was performed by E-test diffusion method on Mueller Hinton Agar (MHA) (20) on ten CNS strains - *S. epidermidis* (5) and *S. saprophyticus* (5). One-fourth of MIC 90% to CNS strains was considered as sub-inhibitory concentration of EEP and ethanol 70% in the synergism assays (18). Seven drugs were evaluated: oxacillin (OXA), vancomycin (VAN), cephalothin (CFL), chloramphenicol (CLO), netilmicin (NET), tetracycline (TET), and clindamycin (CLI). Three susceptibility tests, in duplicate, were performed for each CNS strain in control plates with plain MHA and in plates containing MHA plus one-fourth of MIC 90% of EEP and ethanol 70%. The MIC values in the E-test method ($\mu\text{g/ml}$) were recorded by observing the elliptical inhibitory areas for each strip after incubation at 37°C/18h.

Statistical Analysis

Results from synergism assays were subjected to the Mann-Whitney non-parametric test in order to compare the values ($\mu\text{g/ml}$) of the inhibitory zone in the strip diffusion method (Minitab Statistical Software version 13.32). Results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The results presented in Table 1 indicate that EEP from the South of Brazil (Urubici, Santa Catarina State) showed the greatest amount of flavonoid content, and EEP from the Southeast of Brazil (Botucatu, São Paulo State) showed the greatest phenolic compounds content. These results also show that EEP from the Southeast of Brazil had the greatest antimicrobial action ($p < 0.001$) on CNS growth (Table 2),

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 361

although presenting the lowest flavonoid content. The antimicrobial mechanism of propolis seems to be complex. It may vary according to the composition (2, 9) and can be explained by the synergism between the active substances found in propolis.

In vitro synergism between antimicrobial drugs and propolis, using E-test, has been reported (6, 8, 13, 16, 24, 26), however, no reports of the EEP chemical characteristics and synergism profile was related. Results from *in vitro* synergism assays between the two EEP and the seven antimicrobial drugs performed by the E-test method are presented in Table 3. The propolis samples showed the potential to enhance the antimicrobial drugs efficacy, but the greatest synergism profile was observed in the propolis from the South of Brazil. This propolis sample also showed the greatest flavonoid content although it was less active against CNS strains than Southeast EEP. The sub-inhibitory MICs determined in the synergism assays were 0.21%v/v for Southeast and 0.41%v/v for South EEP samples, and this protocol resulted in greater flavonoid content in Petri plates prepared with South EEP than in those with Southeast EEP. The results support the conclusion that EEP chemical characteristics, especially the flavonoid content, can make clear the synergism between EEP and antimicrobial drugs, but the establishment of the molecular basis of the synergistic effect between EEP and antimicrobial drugs along with further microbiological, pharmacological and clinical trials is needed.

Thus, the results were encouraging and confirmed the strong anti-CNS activity of propolis; determination of the chemical characteristics of EEP showed that the phenolic compounds were responsible for the greatest anti-CNS activity of Southeast EEP, and the flavonoid content was responsible for the greatest synergism rate of South EEP. Since bacteria may be resistant to several antimicrobial drugs, the synergism reported here is relevant, and propolis may constitute an alternative for treating these pathogens.

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 362

Table 1. Physicochemical characteristics of ethanolic extracts of propolis from two regions of Brazil.

Propolis samples	Dry weight (mg/ml)	pH	Flavonoids %	Phenolic compounds (%)
Botucatu (São Paulo State-Southeast)	80.3	5	0.597	5.9
Urubici (Santa Catarina State-South)	87.7	4	0.871	4.7

Table 2. MIC 90% (*) from ethanolic extracts of propolis (EEP) and ethanol (%v/v) control against 32 coagulase-negative *Staphylococcus* strains and one-fourth of MIC 90% values used in synergism assays.

	Brazilian Regions		
	Southeast sample (%v/v)	South sample (%v/v)	Ethanol Control (%v/v)
MIC 90 % (1/4 of MIC 90%)	0.83 (0.21)	1.63 (0.41)	12.72 (3.18)
Range	0.35–1.0	0.4–5.0	5.0–13.0

(*) Antimicrobial activity of Southeast EEP > South EEP > Ethanol control: $p < 0.05$

Table 3. Synergism (X)* between ethanolic extracts of propolis (South and Southwest samples); ethanol control and antimicrobial drugs by the E-test method against 10 coagulase-negative *Staphylococcus* strains: *S. epidermidis* (5) and *S. saprophyticus* (5).

Antimicrobial drugs	Brazilian regions		
	Southeast sample	South sample	Ethanol control
(Cephalotin) CFL	-	X	-
(Oxacillin) OXA	-	X	-
(Netilmicin) NET	X	X	-
(Clindamycin) CLI	X	X	X
(Vancomycin) VAN	-	X	-
(Tetracycline) TET	X	X	-
(Chloranphenicol) CLO	-	-	-

*Synergism when $p < 0.05$

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 363

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dra. Lidia Raquel de Carvalho (Department of Biostatistics /IBB/UNESP/Botucatu) for statistical analysis, and to FAPESP (The São Paulo State Research Foundation).

REFERENCES

- 1 BANKOVA VS., CASTRO SL., MARCUCCI MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.*, 2000, 31, 3-15.
- 2 BANSKOTA AH., TEZUKA Y., KADOTA S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.*, 2001, 15, 561-71.
- 3 BOSIO K., AVANZINI C., D'AVOLIO A., OZIMO O., SAVOIA D. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31, 2000, 174-7.
- 4 BURDOCK GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem. Toxicol.*, 1998, 36, 347-63.
- 5 CASTALDO S., CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 2001, 73, S1-S6.
- 6 DETOMA P., OZINO OL. Azione della propoli su microrganismi dell'ambiente ospedalino. *Ann. Microbiol. Enzimol.*, 1991, 41, 231-6.
- 7 DRAGO L., MOMBELLI B., DE VECCHI E., FASSINA MC., TOCALLI L., GISMONDO MR. *In vitro* antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemother.*, 2002, 12, 390-5.
- 8 FERNANDES JUNIOR A., BALESTRIN EC., BETONI JEC., ORSI RO., CUNHA MLRS., MONTELLI AC. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2005, 100, 563-6.
- 9 GEBARA ECE., LIMA LA., MAYER MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz. J. Microbiol.*, 2002, 33, 365-9.
- 10 GONSALES GZ., ORSI RO., FERNANDES JUNIOR A., RODRIGUES P., FUNARI SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2006, 12, 276-84.
- 11 HAVSTEEM B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacology potency. *Biochem. Pharmacol.*, 1983, 32, 1141-8.
- 12 IKENO K., IKENO T., MIYAZAWA C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res.*, 1991, 25, 347-51.

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 364

13 KEDZIA B., HOLDERNA E. Investigations upon the combined action of antibiotics and propolis on *Staphylococcus aureus*. *Herba Polonica*, 1986, 32, 187-95.

14 KONEMAN EW., ALLEN SD., JANDA NM., SCHRECKEMBERGER PC., WINN JR WC. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Medis, 2005.

15 KOO H., ROSALEN PL., CURY JA., PARK YK., BOWEN WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2002, 46, 1302-9.

16 KROL W., SCHELLER S., SHANI J., PIETZ G., CZUBA Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-Forsch.*, 1993, 43, 607-9.

17 KUSUMOTO T., MIYAMOTO RH., DOI S., HIROYUKI S., YAMADA H. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, 49, 1207-9.

18 MAHON CR., MANUSELIS JR G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: WB Saunders, 1995.

19 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6.ed. Wayne: NCCLS, 2003. [Approved Standard M7.A6]

20 NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement*. Wayne: CLSI, 2005. M100-S15.

21 ORSI RO., SFORCIN JM., FUNARI SRC., FERNANDES JUNIOR A., BANKOVA V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella typhi*. *Braz. J. Microbiol.*, 2006, 37, 108-12.

22 ORSI RO., SFORCIN JM., RALL VLM., FUNARI SRC., BARBOSA L., FERNANDES JUNIOR A. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2005, 11, 109-16.

23 SANTOS FA., BASTOS EMA., UZEDA B., CARVALHO MAR., FARIAS ESA., BRAGA FC. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol.*, 2002, 80, 1-7.

R. P. Mantovani *et al.* ANTI-COAGULASE-NEGATIVE *Staphylococcus* ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM TWO BRAZILIAN REGIONS AND SYNERGISM WITH ANTIMICROBIAL DRUGS BY THE E-TEST METHOD. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 2008, 14, 2, p. 365

24 SCHELLER S., DWORNICZAK S., WALDEMAR KK., RAJCA M., TOMCZIK A., SHANI J. Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Z. Naturforsch.*, 1999, 54, 549-53.

25 SFORCIN JM., FERNANDES JUNIOR A., LOPES CAM., BANKOVA V., FUNARI SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 2000, 73, 243-9.

26 STEPANOVIC S., ANTIC N., DAKIC I., SVABIC-VLAHOVIC M. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol. Res.*, 2003, 158, 353-7.

27 TAKAISI-KIKUNI NB., SCHILCHER H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.*, 1994, 60, 222-7.

Anexo 6

PROBST, I.S., SFORCIN, J.M., RALL, V.L.M., FERNANDES, A.A.H., **FERNANDES JÚNIOR A.** Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. ***Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease.*** v. 17, n.02, p. 159-167, 2011.



Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products

Probst IS (1), Sforcin JM (1), Rall VLM (1), Fernandes AAH (2), Fernandes Júnior A (1)

(1) Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP – Univ Estadual Paulista), Botucatu, São Paulo State, Brazil; (2) Department of Chemistry and Biochemistry, Botucatu Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP – Univ Estadual Paulista), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Abstract: In the present study, *Apis mellifera* propolis and essential oils (EOs) obtained from aromatic plants were evaluated as alternative antimicrobials. We aimed to establish the antimicrobial activity of ethanolic extracts of propolis (EEP) from *Apis mellifera* and of EOs from *Caryophyllus aromaticus*, *Zingiber officinale*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Mentha piperita* against 32 *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human clinical specimens. The antimicrobials were diluted in agar and the minimal inhibitory concentrations (MIC) were found whereas MIC_{90%} values were calculated. Time-kill curve assays using mixtures containing one quarter of MIC_{90%} for EEP with all EOs as well cinnamon EO were performed. The cinnamon EO was found to be the most efficient, with MIC_{90%} values of 1.22 and 0.96 mg x mL⁻¹ respectively against *S. aureus* and *E. coli*, whereas MIC_{90%} of EEP were 1.86 and 20.12 mg x mL⁻¹ respectively against *S. aureus* and *E. coli*. The combinations of EEP with ginger and mint EOs, and cinnamon with ginger and clove EOs, showed synergistic effects. Consequently, further studies are necessary to confirm these activities *in vivo* and to evaluate the phytochemical characteristics of natural products.

Key words: *Apis mellifera*, aromatic plants, ethanolic extract of propolis, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

INTRODUCTION

The development of multidrug-resistant pathogens has been related to the occurrence of over- and under-dosage of antimicrobials (1, 2). One strategy employed to overcome resistance mechanisms is the use of combinations of drugs and several plant extracts, which had exhibited synergistic activity against microorganisms (3). Among the natural sources of antimicrobial agents utilized to treat infectious diseases, propolis and essential oils from aromatic plants were exhaustively studied (4-8).

Propolis has been used since ancient times by numerous populations, including the Assyrians, Greeks, Romans, Incas and Egyptians (9-10). It is a resinous bee product from buds and other parts of plants surrounding the hive, with addition of

saliva, waxes and pollen (11-13). Bees mix the original propolis with beeswax and β -glucosidase that they secrete during propolis collection. The resulting material is used by bees to seal holes in the hives, to exclude draughts, to protect against external invaders and to mummify their carcasses (14). It has been shown that the antimicrobial activity of propolis is attributed to phenolic compounds, especially flavonoids – that are widely distributed through leaves, fruits, seeds and other parts of plants – and which are recognized for their antioxidant activity (5, 15-17). Mantovani *et al.* (18) evaluated the chemical composition of propolis samples collected in southern and southeastern Brazil, and reported that samples from the south had a higher amount of flavonoids, while the southeastern samples showed a higher amount of phenolic compounds.

Variations in the composition of propolis extracts are also responsible for different results in antimicrobial activity tests (19-20).

Aromatic plants are used for multiple purposes (e.g., maintaining health, hygiene and life quality) in the traditional culture of many countries such as India and Brazil (5, 21). The interest in aromatic plants and their essential oils is due to their numerous antimicrobial compounds with potential to directly or indirectly inhibit bacterial enzyme systems, resulting in bactericidal or bacteriostatic effects (22, 23). Sartoratto *et al.* (24) established that the presence of various chemical compounds in the essential oils of some plants is crucial for their antimicrobial properties.

Eugenol is an active compound from clove essential oils (*Caryophyllus aromaticus* L., family Myrtaceae), which has been used as analgesic, antispasmodic, bactericidal, fungicidal and antiparasitic agent, as well as antiseptic agent in dentistry. Recent studies have shown the possibility of using clove EO as a replacement for some chemical additives in the preservation of meat and fish (25-27).

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, family Zingiberiaceae) is an important spice used as preservative in food and as an aphrodisiac. Some compounds found in its EO may act in stomach, facilitating digestion and inhibiting nausea and vomiting, and its major constituent is zingiberene (28, 29). In India, small pieces of ginger rhizome are mixed with honey and used to treat coughs, sore throat, fever and colds (30).

Peppermint (*Mentha piperita* L., family Lamiaceae) is utilized in several countries for several purposes, including Brazil, where it is employed as a local anesthetic to relieve cramps, headaches and muscle pain, and for influenza and throat infections, stimulating perspiration and fever. In addition, the plant is used to treat insect bites, and to promote restful sleep and healing. It is also utilized in cooking as a spice for salty foods or flavoring tea. The peppermint EO is consumed worldwide and menthone is of its main components (28). The EO has moderate antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative microorganisms, bactericidal effects against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains (2).

Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume, family Lauraceae) was employed by ancient Greeks, Romans and Jews to flavor wine and for religious purposes in India and China. It possess several

biological activities such as analgesic, antispasmodic, astringent, aphrodisiac, hypoglycemic, carminative, haemostatic, insecticidal and antiparasitic properties. In folk medicine, it is used in elixirs and liquors for weakness and headaches, with its delicate aroma and sweet and spicy flavor, and it has been used as flavoring in meat and fast food, sauces, confectionery, beverages, pharmaceuticals, dental care products and perfumes, although it can be aggressive to the skin (28, 31). More recently, studies on the antimicrobial activity of cinnamon EO from leaves and bark were performed (32, 33). Chao *et al.* (34) reported that EO from cinnamon bark showed antimicrobial activity against several species of fungi, bacteria and viruses tested in clinical trials.

Several studies on the synergism among natural products were carried out (3, 7, 8, 35, 36). It is expected that mixtures of propolis and EOs may lead to a better inhibitory action than that achieved by the substance alone (37). Combinations of EOs from several plants were analyzed by Gutierrez *et al.* (38), in order to find successful interactions among them. These authors also reported that such combinations, especially when oregano was used, were able to potentiate antimicrobial activity against *Bacillus cereus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains in food systems. Although the oils previously tested were not quite the same as those employed in our research, we aimed to verify the *in vitro* antimicrobial activity of propolis (EEP) from *Apis mellifera* and essential oils from clove, ginger, cinnamon and peppermint on *E. coli* and *S. aureus* strains from human specimens. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined through the agar dilution method and the synergism among these natural products was assayed by the time-kill curve method.

MATERIALS AND METHODS

Ethanollic Extract of Propolis (EEP)

Propolis samples from *Apis mellifera* were collected at the experimental farm of the São Paulo State University (UNESP), Botucatu. The ethanolic extract of propolis (EEP) was prepared using 30 g of raw propolis diluted in 100 mL of 70% ethanol. After seven days at room temperature, the EEP was filtered and stored in dark bottles at 4°C. One milliliter was used to determine the dry weight of EEP by solvent evaporation at 50°C (13).

Essential Oils (EOs)

EOs of clove (*Caryophyllus aromaticus*) (inflorescence) and ginger (*Zingiber officinale*) (fresh rhizomes) were prepared in a cleverger apparatus (model M480, Marconi, Brazil) at our laboratory. Peppermint (*Mentha piperita*) (leaves) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) EOs were purchased from a Brazilian company that supplies natural products, where EOs were produced by steam distillation. One milliliter of each natural product was used to determine the dry weight of EEP and the density of EOs (39). These values were used to establish minimal inhibitory concentration (MIC) in mg x mL⁻¹ when the susceptibility assays were performed.

Bacterial Strains

Fifteen strains of *S. aureus* and fifteen of *E. coli* isolated from human biological material from patients of the Botucatu Medical School, UNESP, were used in the susceptibility assays. American Type Culture Collection (ATCC) strains of each species were used (*S. aureus* ATCC 33591 and *E. coli* ATCC 25922) to standardize the microbiological tests. The strains were stored at -70°C, and before the susceptibility tests they were inoculated in sheep blood agar (Difco, USA) to establish their viability. This work was approved by the Ethics Research Committee (CER) of UNESP.

Susceptibility Tests

Minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC tests were performed by diluting the natural products in agar, as recommended by the CLSI guidelines (40), followed by determining their respective MIC_{90%} values.

Petri dishes containing Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco, USA) plus Tween 80 (0.3% v/v) and the natural products achieved concentrations ranging from 0.025% to 3.5% v/v for the EOs, and from 0.1% to 14% v/v for EEP and 70% ethanol. These concentrations were transformed into mg x mL⁻¹ according to EOs and ethanol densities and EEP dry weight. The bacterial strains were inoculated in brain heart infusion (BHI) (Difco, USA) (37°C for 24 hours) and standardized at 0.5 on the McFarland scale to achieve a bacterial suspension of circa 10⁵ colony forming units (CFU x mL⁻¹). Thirty-two bacterial strains (16 *S. aureus* and 16 *E. coli*) were inoculated in Petri dishes using a Steers multiple inoculator and after 24 hour at 37°C the MIC values were recorded

(presence or absence of colonies of each of the bacterial strains) and the MIC_{90%} values were established. The positive controls of growth of the bacterial strains in the absence of natural antimicrobials were performed by inoculating strains on Petri dishes containing MHA plus 3% of Tween 80 and incubation at 37°C for 24 hours.

Time-kill curve and interactions between natural antimicrobials

Bacterial counts of *S. aureus* and *E. coli* strains by the pour plate method on plate count agar (PCA) (Difco, USA) were performed in order to establish any synergistic effects when natural products were added to BHI plus Tween 80% (0.3% v/v). The mixtures reached values of one quarter of the MIC_{90%} in natural products when EEP was combined with EOs and cinnamon EO with other EOs. The 10⁵ CFU x mL⁻¹ bacterial suspensions were inoculated in BHI tubes (time zero) and after 1.5, 3, 6, 9 and 24 hours at 37°C. Aliquots of each culture were recovered and plated on PCA by the pour plate method. After 24 hours at 37°C, the CFU x mL⁻¹ values were recorded. As in previous susceptibility tests in which the values of MIC were discovered, control assays were carried out and normal bacterial growth curve was also assessed when CFU x mL⁻¹ was achieved.

Statistical Analysis

Data were analyzed using analysis of variance, followed by the Student's t-test, and p > 0.05 indicated no significant difference between treatments. The statistical software SAS version 9.0, licensed by UNESP in 2009, was employed.

RESULTS AND DISCUSSION

Essential Oils and EEP

EOs had different density values (Table 1), clove EO presented the highest value (1.101 mg x mL⁻¹) and ginger EO had the lowest density (896 mg x mL⁻¹). During the extraction process, clove oil accumulated in the bottom of the Fiorentino distiller bottle, revealed the expected higher density of this oil. The dry weight of the EEP (172.2 mg x mL⁻¹) was in agreement with Fernandes Júnior *et al.* (13). In a scale of increasing densities and concentrations, the values were as follow: EEP < 70% ethanol < ginger EO < peppermint EO < cinnamon EO < clove EO.

Probst IS, et al. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products

Table 1. Density values ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$) of essential oils (EO) and 70% ethanol and EEP (ethanolic extract of propolis) dry weigh ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$)

Ginger EO	Peppermint EO	Clove EO	Cinnamon EO	EEP	Ethanol 70%
896.6	918.9	1101.0	1021.9	172.2	790.0

Table 2. Mean and standard deviation of minimal inhibitory concentration (MIC) values ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$) for all antimicrobials against *S. aureus* and *E. coli* strains

Bacteria	Ginger	Peppermint	Clove	Cinnamon	EEP	70% Ethanol
<i>S. aureus</i>	1.1920 \pm 0.75 aA	3.67 \pm 1.50 aA	1.27 \pm 0.48 aB	1.15 \pm 0.35 aB	1.54 \pm 0.62 aA	71.68 \pm 2.09 bB
<i>E. coli</i>	7.0523 \pm 3.13 bB	31.25 \pm 7.11 dB	1.27 \pm 0.48 aB	0.99 \pm 0.13 aB	19.24 \pm 2.20 cB	70.12 \pm 3.02 eB

Different small letters indicate differences among the natural products ($p \leq 0.05$).
Different capital letters indicate differences among the bacterial strains ($p \leq 0.05$).

Antimicrobial Activity of Natural Products

EOs and EEP had similar results for antimicrobial activity against *S. aureus* (Table 2) with no significant differences, and 70% ethanol control showed the lowest inhibitory activity. Cinnamon and clove EOs presented higher inhibitory activities against *E. coli*, followed by ginger EO and EEP. Peppermint EO was less active than the other EOs. Once again, 70% ethanol showed the lowest inhibitory activity against *E. coli*. Table 3 presents the $\text{MIC}_{90\%}$ values and the effects of MIC against the bacterial strains. All strains challenged in the susceptibility assays showed normal growth on control Petri plates with MHA plus Tween 80 (0.3% v/v) when inoculated and incubated under the same conditions of the treatment assays. Thus, the absence of growth or absence of colonies of bacterial strains on Petri dishes containing natural

antimicrobials can be explained by the inhibitory effect of antimicrobials and not due to nutritional or environmental failures during the cultivation.

The $\text{MIC}_{90\%}$ values were distinct for the different bacterial strains. Peppermint EO (6.18 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$) showed a great inhibitory effect on *S. aureus* compared to its action on *E. coli* (30 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$), while regarding EEP, the $\text{MIC}_{90\%}$ values were 1.86 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$ and 20.12 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$ respectively against *S. aureus* and *E. coli* (Table 3). Ethanol, the EEP solvent, had no effect on EEP antimicrobial activity.

The structure of gram-negative bacterial wall, which presents an outer complex membrane, including two lipid bilayers, could be the reason for the obtained results (41, 42). These layers comprise physical barriers between microorganisms and the environment, preventing interactions of the bacterial cell with harmful substances. Gram-

Table 3. $\text{MIC}_{90\%}$ and range of MIC values ($\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$) of EO, EEP and 70% ethanol against 16 *S. aureus* and 16 *E. coli* strains

Bacteria		Ginger	Peppermint	Clove	Cinnamon	EEP	70% Ethanol
<i>S. aureus</i>	$\text{MIC}_{90\%}$	1.7	6.2	1.6	1.2	1.8	72.4
	Range of MIC	0.6-2.7	2.7-6.3	0.5-2.2	1.2-2.0	0.7-3.4	60.8-72.4
<i>E. coli</i>	$\text{MIC}_{90\%}$	8.7	30.0	1.6	1.0	20.1	72.3
	Range of MIC	0.8-13.5	4.6-33.0	0.5-2.2	0.5-1.0	15.5-20.6	66.3-72.4

Probst IS, et al. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products

positive bacteria present only one relatively permeable membrane, rendering them more susceptible to interactions with the environment (43). Another possible cause of the resistance against phytotherapeutics is the presence of multiresistant sites that promote the synthesis and secretion of amphipathic toxins (37).

In addition to the morphological differences among bacteria, there must be variations in the chemical compositions of EOs. Some plants have active ingredients that can easily penetrate bacteria, and some fail to interact with the bacterial cell, reducing their antimicrobial potential. Thus, the composition of EOs must be chemically analyzed to allow a study on the interactions alone. The chemical composition of EOs may present large variations according to several factors including age, time of harvest and origin of the plant, which may interfere with the presence/absence of some of the active chemical compounds, as well as may influence in the volatilization of these compounds (44).

Synergism between Natural Products

The time-kill curves of natural products alone, with their $MIC_{90\%}$ values (or one quarter of

$MIC_{90\%}$ values) for EEP and EOs against *S. aureus* and *E. coli* strains are shown in Figures 1 and 2. The survival rates of *S. aureus* and *E. coli* strains in mixtures containing one quarter of $MIC_{90\%}$ values of cinnamon EO with ginger, clove and peppermint EOs are displayed in Figures 3 and 4.

Synergism was shown in various combinations and three or more log reductions in the $CFU \times mL^{-1}$ of the initial inoculum provided evidence of bactericidal effect (45). Bacteriostatic activity was recorded when the scores were near the original number without going over the test scores obtained in the positive control of bacteria. Thus, $MIC_{90\%}$ values established were bactericidal for clove, ginger and peppermint EOs, while cinnamon EO, EEP and 70% ethanol were bacteriostatic against *S. aureus* strains. Clove and cinnamon EOs showed bactericidal effects, while ginger and peppermint EOs as well as EEP and 70% ethanol showed bacteriostatic effect against *E. coli* strains.

Synergism with bacteriostatic effects was established in the assays when EEP was combined with ginger and peppermint EO, and in the mixtures with cinnamon and clove EOs and cinnamon and peppermint EOs on *S. aureus*

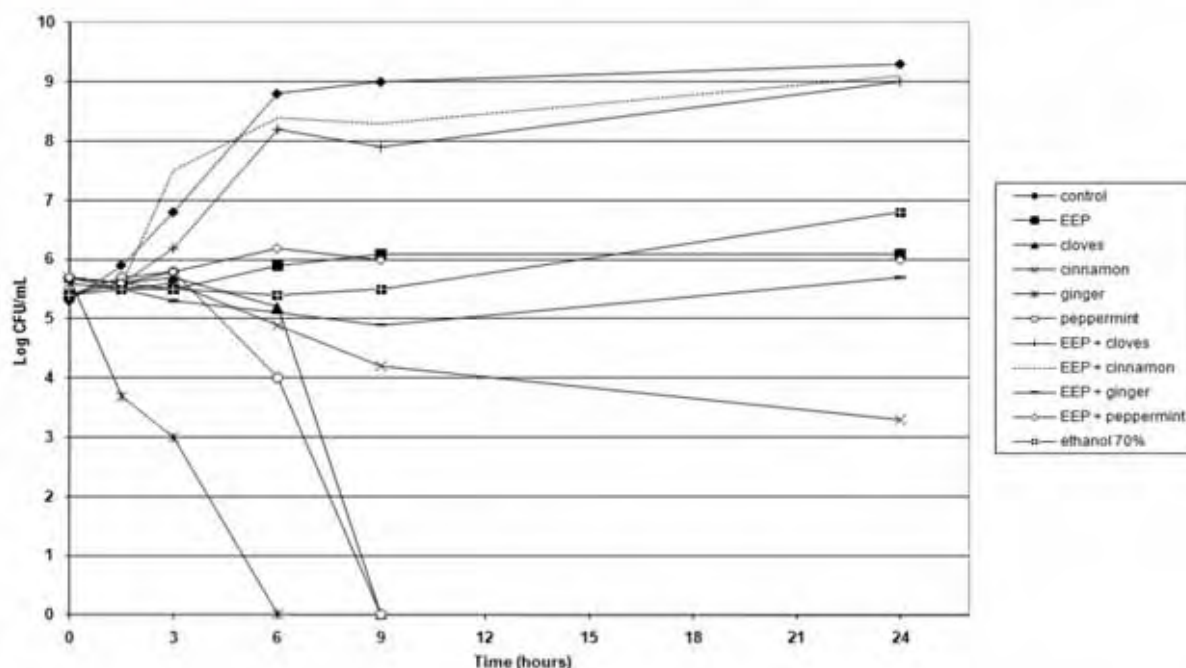


Figure 1. Log $CFU \times mL^{-1}$ values in the time-kill curve of $MIC_{90\%}$ values of the products alone and in combination with one quarter of $MIC_{90\%}$ values for EEP with essential oils against *S. aureus* strain.

Probst IS, et al. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products

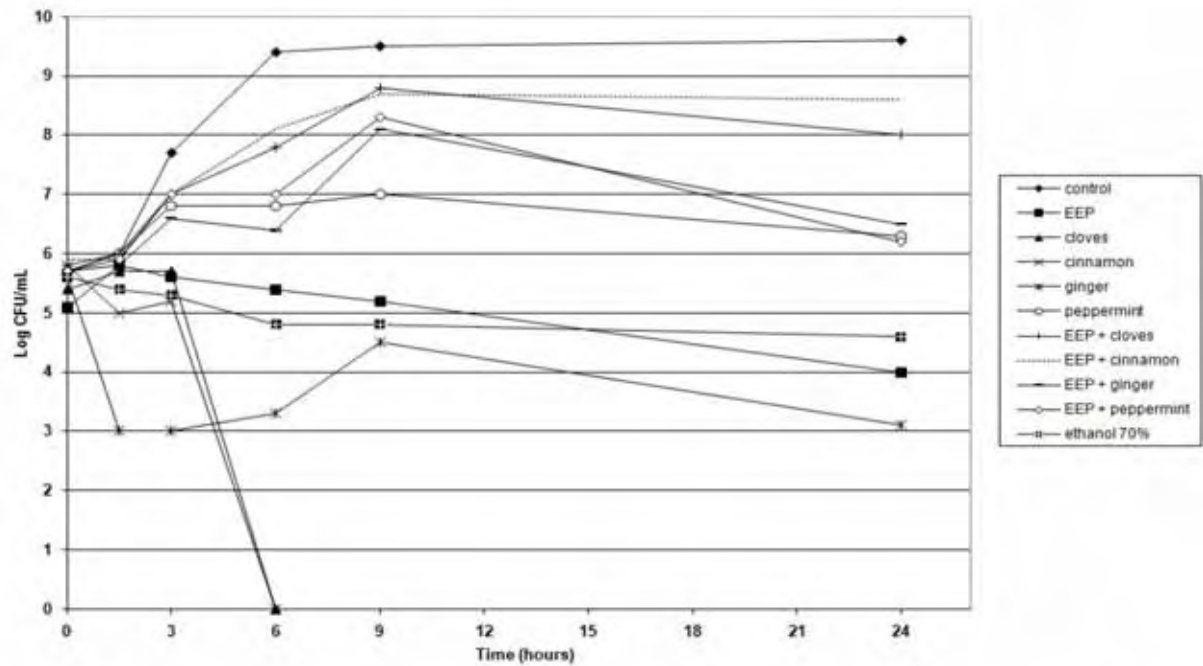


Figure 2. Log CFU x mL⁻¹ values in the time-kill curve of MIC_{90%} values of the products alone and in combination with one quarter of MIC_{90%} values for EEP with essential oils against *E. coli* strain.

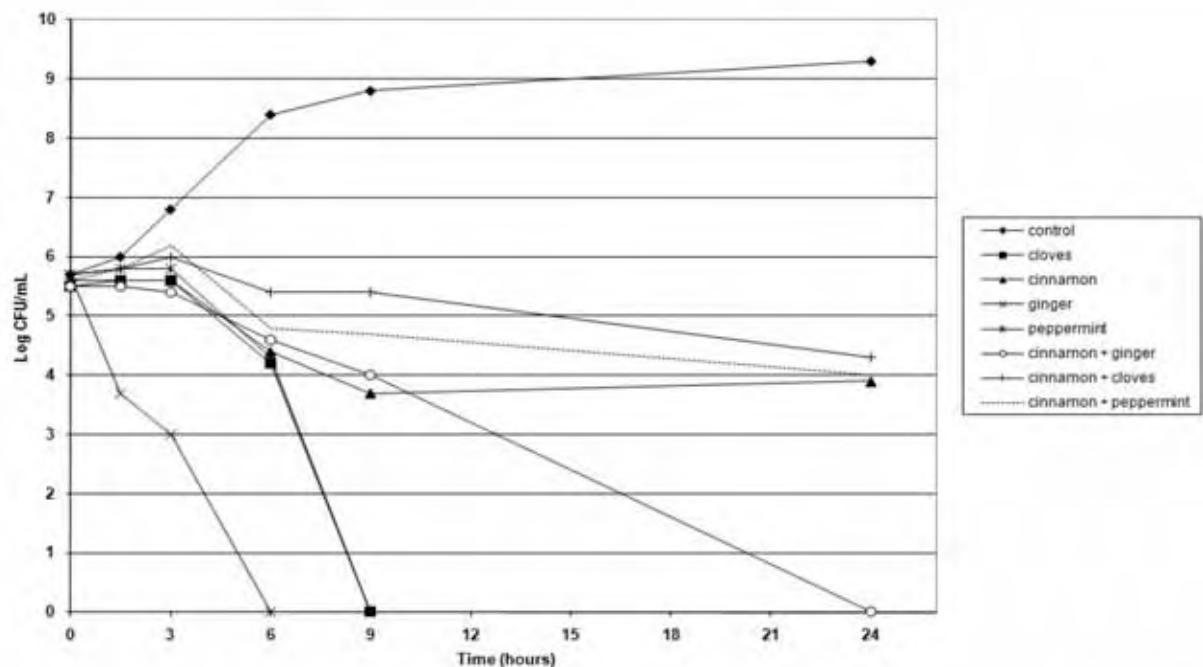


Figure 3. Log CFU x mL⁻¹ values in the time-kill curve of MIC_{90%} values of the products separately and in combination with one quarter of MIC_{90%} values for cinnamon oil with essential oils against *S. aureus* strain.

Probst IS, et al. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products

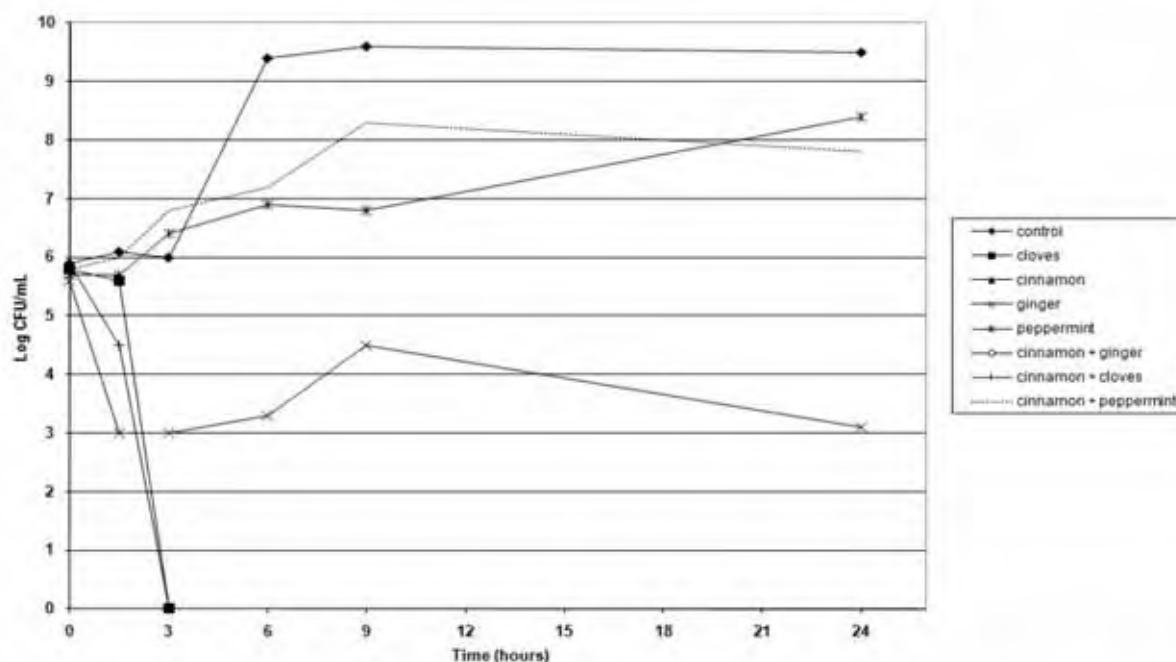


Figure 4. Log CFU x mL⁻¹ values in the time kill curve of MIC90% values of the products separately and in combination with one quarter of MIC90% values for cinnamon oil with essential oils against *E. coli* strain

growth (Figure 1). Synergism with bactericidal effect was also verified in the combination of cinnamon and ginger EOs (Figure 3) against *S. aureus*. Whereas there were significant differences in the antimicrobial activities of the natural products on the studied bacterial strains, synergism with bacteriostatic effect against *E. coli* strains by EEP with ginger and peppermint EOs and bactericidal effects of cinnamon EO with ginger and clove EOs are shown in Figures 2 and 4, respectively. Al-Bayati (46) reported that combinations of thyme (*Thymus vulgaris*) and anise (*Pimpinella anisum*) EOs showed inhibitory activity against pathogenic bacteria, and that these EOs were more efficient than the drug Maxipime in the assays. These authors also found that the association with EO potentiated the effects of the compounds of each plant, assuring that microorganism were inhibited by various chemical compounds at the same time, increasing the antibacterial activity of the products. This phenomenon was evident against *P. aeruginosa* strains, a pathogen resistant to isolated EOs, methanolic extracts and antimicrobial drugs.

Moreover, the evaluation of the interactions between EEP and EOs should be clarified because Garedewa *et al.* (37) reported that the use of propolis at concentrations below the MIC could increase the growth of the microorganisms, whereas at higher levels they may inhibit or even kill them. This event is known as "hormesis", and was first mentioned by Calabrese and Baldwin (47). Thus, because the present study provides information on propolis extract, which is frequently used for treatment of some common infectious diseases, and if employed at low concentrations, we believe that it can even worsen the disease.

CONCLUSIONS

Our results showed antibacterial properties in all of the natural products studied. Moreover, combinations of EEP with ginger and peppermint EOs, and cinnamon with ginger and clove EOs showed synergistic effects that may be valuable in the development of phytotherapeutics with antimicrobial actions against gram-positive and gram-negative microorganisms. Since the tests

were performed *in vitro*, further studies focusing on the safe use of these substances in humans and animals, especially against *S. aureus* and *E. coli* infections, should be conducted. In addition, there is a global tendency towards the development of herbal drugs from different mixtures of natural products aiming at the standardization of active compounds in these products.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP) for the financial support. Thanks are also due to Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi who kindly provided the samples used in the assays.

COPYRIGHT

© CEVAP 2011

SUBMISSION STATUS

Received: November 16, 2011.

Accepted: February 11, 2011.

Abstract published online: February 16, 2011.

Full paper published online: May 31, 2011.

CONFLICTS OF INTEREST

There is no conflict.

FINANCIAL SOURCE

The State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) and Foundation for the Development of UNESP (FUNDUNESP) provided the financial grants.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

The present study was approved by the Ethics Research Committee (CER) of the Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP – Univ Estadual Paulista), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

CORRESPONDENCE TO

ARY FERNANDES JÚNIOR, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil. Phone: +55 14 38116058. Email: ary@ibb.unesp.br.

REFERENCES

- Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. *Cienc Rural*. 2004;34(1):159-63.
- Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*. 2006;77(4):279-85.
- Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008;15(8):639-52.
- Kujungiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(3):235-40.
- Packer JF, Luz MMS. Evaluation and research method for natural products inhibitory activity. *Rev Bras Pharmacogn*. 2007;17(1):102-7.
- Silva MTN, Ushimaru PI, Barbosa LN, Cunha MLRS, Fernandes Júnior A. Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. *Braz J Medicinal Plants*. 2009;11(3):257-62.
- Zago JAA, Ushimaru PI, Barbosa LN, Fernandes Júnior A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from humans infections. *Rev Bras Pharmacogn*. 2009;19(4):828-33.
- Silva NCC, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2010;16(3):402-13.
- Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR. Propolis: anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova*. 2002;25(2):321-6.
- Castaldo S, Capasso E. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73(suppl 1):S1-6.
- Pinto MS, Faria JE, Message D, Cassini STA, Pereira CS, Gioso MM. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2001;38(6):278-83.
- Fernandes Júnior A, Balestrin ECD, Cunha MRLS. Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellifera* preparados com diferentes concentrações de etanol. *Rev Ciênc Farm*. 2003;24(2):147-52.
- Fernandes Júnior A, Balestrin EC, Betoni JE, Orsi Rde O, da Cunha Mde L, Montelli AC. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(5):563-6.
- Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*. 2002;73 Suppl 1:S7-20.
- Menezes H. Propolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq Inst Biol*. 2005;72(3):405-11.
- Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(1):1-9.
- Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos

- presentes na saliva de humanos. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18(1):84-9.
18. Mantovani RP, Rall VLM, Batalha JEN, Fernandes AAH, Fernandes Júnior A. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of propolis from two Brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by E-Test method. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2008;14(2):357-65.
 19. Fernandes Júnior A, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. *Ciênc Rural.* 2006;36(1):294-7.
 20. Gonzalez GZ, Orsi RO, Fernandes Júnior A, Rodrigues P, Funari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2006;12(2):276-84.
 21. Sofia PK, Prasad R, Vijay VK, Srivastava AK. Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens. *Int J Food Sci Technol.* 2007;42(8):910-5.
 22. Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;97(2):305-11.
 23. Ernandes FMPG, Garcia-Cruz CH. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. *Bol Centro Pesqui Process Aliment.* 2007;25(2):193-206.
 24. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2004;35(4):275-80.
 25. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
 26. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci.* 2006;73(2):236-44.
 27. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* 2007;18(5):414-20.
 28. Nepomuceno R. Viagem ao fabuloso mundo das especiarias. 5th ed. Rio de Janeiro: José Olympio; 2007. 250 p.
 29. Maia NB, Bovi AO, Duarte FR. Extraction and analysis of ginger essential oil: processing and drying. *Bragantia.* 1991;50(1):83-92.
 30. Jamir TT, Sharma HK, Dolui AK. Folklore medicinal plants of Nagaland, India. *Fitoterapia.* 1999;70(4):395-401.
 31. Jayatilaka A, Poole SK, Poole CF, Chichila TMP. Simultaneous micro steam distillation/solvent extraction for the isolation of semivolatile flavor compounds from cinnamon and their separation by series coupled-column gas chromatography. *Anal Chim Acta.* 1995;302(2-3):147-62.
 32. Maidment C, Dyson A, Haysom. A study into the antimicrobial effects of cloves (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) using disc-diffusion assay. *Nutrition Food Sci.* 2006;36(4):225-30.
 33. Senhaji O, Faid M, Kalalou I. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by essential oil from *Cinnamomum zeylanicum*. *Braz J Infec Dis.* 2007;11(2):234-6.
 34. Chao SC, Young DG, Oberg CJ. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essential Oil Res.* 2000;12(5):639-49.
 35. Betoni JE, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Júnior A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(4):387-90.
 36. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine.* 2007;14(11):727-32.
 37. Garedew A, Schmolz E, Lamprechtb I. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an *in vitro* approach. *Thermochimica Acta.* 2004;422(1-2):115-24.
 38. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol.* 2008;124(1):91-7.
 39. Fonseca P, Librand APL. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Rev Bras Cienc Farm.* 2008;44(2):271-7.
 40. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15. Wayne, PA: CLSI; 2005.
 41. Nieva Moreno MI, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J Ethnopharmacol.* 1999;68(1-3):97-102.
 42. Scazzocchio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 2006;161(4):327-33.
 43. Perussi JR. Photodynamic inactivation of microorganisms. *Quim Nova.* 2007;30(4):988-94.
 44. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quim Nova.* 2007;30(2):374-38.
 45. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR. Comparative bactericidal activities of daptomycin and vancomycin against glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA isolates. *Antimicrob Agents and Chemoter.* 2006;50(12):4195-7.
 46. Al-Bayati FA. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol.* 2008; 116(3):403-6.
 47. Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis as a biological hypothesis. *Environ Health Perspect.* 1998;106(Suppl 1):357-62.

Anexo 7

ORSI, R.O.; **FERNANDES JÚNIOR, A.**; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian própolis in vitro against *Salmonella* Typhi and synergism with antibiotics on the ribosome. *Natural Product Research*, v.26, p. 430-437, 2012

The effects of Brazilian and Bulgarian propolis *in vitro* against *Salmonella* Typhi and their synergism with antibiotics acting on the ribosome

R.O. Orsi^a, A. Fernandes^b, V. Bankova^c and J.M. Sforcin^{b*}

^aDepartment of Animal Production and Exploration, School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, UNESP, Botucatu, State of São Paulo, Brazil; ^bDepartment of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, UNESP, Botucatu, State of São Paulo, Brazil; ^cInstitute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria

(Received 15 January 2010; final version received 8 May 2010)

Salmonella enterica serovar Typhi is the causative agent of typhoid fever in humans, and the use of antibiotics is essential for controlling this infection; however, the excessive use of antibiotics may select resistant strains. Propolis is a honeybee product and its antimicrobial activity has been intensively investigated. Thus, the objective of this study was to investigate a possible synergism between propolis (collected in Brazil and Bulgaria) and antibiotics acting on the ribosome (chloramphenicol, tetracycline and neomycin) against *Salmonella* Typhi *in vitro*. The synergism was investigated by using $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of the minimum inhibitory concentration for propolis and these antimicrobial agents, evaluating the number of viable cells according to the incubation time. Brazilian propolis showed a bacteriostatic action against *S. Typhi*, while Bulgarian propolis showed a bactericidal activity and a synergistic effect with the three antibiotics. Variations in the biological assays might be due to the differences in their chemical compositions. Based on the results, one may conclude that Bulgarian propolis showed an important antibacterial action, as well as a synergistic effect with antibiotics acting on the ribosome, which points out a possible therapeutic strategy evaluating the use of propolis preparations for the treatment of *Salmonella* Typhi infection.

Keywords: propolis; *Salmonella*; antimicrobial activity; antibiotics; synergism

1. Introduction

Typhoid fever is both a water- and food-borne gastrointestinal infection, common among children and young adults in developing countries (Al-Aqeedi, Cama, Al-Aani, & Al-Ani, 2009). Typhoid fever is endemic in several geographic regions, and outbreaks caused by *Salmonella enterica* serovar Typhi are common (Ghenghesh et al., 2009).

*Corresponding author. Email: sforcin@ibb.unesp.br

The resistance of *Salmonella* serovars to antimicrobial agents has been widely reported (Lewin, 1991; Orsi, Sforcin, Funari, Fernandes, & Bankova, 2006; Poppe et al., 2001), and, as an alternative, several natural products with antimicrobial activity have been investigated.

Propolis is a honeybee product and its chemical composition depends mainly on the local flora (Sforcin, 2007). Propolis' antibacterial (Sforcin, Fernandes, Lopes, Bankova, & Funari, 2000), antifungal (Sforcin, Fernandes, Lopes, Funari, & Bankova, 2001), antiviral (Búfalo et al., 2009) and antiparasite (Freitas, Shinohara, Sforcin, & Guimarães, 2006) activities have been described.

Krol, Scheller, Shani, Pietsz, and Zcuba (1993) observed the synergistic effect of propolis with the antibiotics streptomycin and cloxacillin towards *Staphylococcus aureus*, and Scheller et al. (1999) reported the synergism between propolis and antibiotics used against mycobacteria. The interaction between propolis and antimicrobial agents could reduce the clinical concentrations of such drugs, minimising the occurrence of side effects, contributing to the control of resistant bacterial strains, and potentiating the antibiotic therapy.

In a previous work, we verified that propolis diminished the resistance of the bacteria wall to antibiotics (Orsi et al., 2006). Herein, we wish to report the antibacterial action of Brazilian and Bulgarian propolis *in vitro*, in order to compare the activity of the samples produced in different geographic regions. Moreover, a possible synergistic effect of the propolis, with three widely used antibiotics acting on the ribosome (chloramphenicol, tetracycline and neomycin), reducing their minimal inhibitory concentration (MIC) was investigated.

2. Results and discussion

Several authors have studied the antimicrobial activity of propolis (Scazzocchio, D'Auria, Alessandrini, & Pantanella, 2006). In this study, *S. Typhi* was susceptible to Brazilian (MIC = 9.9% v/v) and Bulgarian propolis (MIC = 10.0% v/v) *in vitro*. It is well documented that Gram-positive bacteria are very sensitive to propolis action, while Gram-negative ones are more resistant. In fact, the MIC for *S. Typhi* was far above the MIC for Gram-positive bacteria (0.5% v/v for *S. aureus*) (Sforcin et al., 2000). With regards to the effects of 70% ethanol, which was used as a propolis solvent, its inhibitory action was seen only at the concentration of 12.6% v/v.

Although Brazilian and Bulgarian samples were produced in distinct geographic regions, they showed a similar MIC (9.90% and 10.0%, respectively). However, their action on *Salmonella* survival curve was significantly different: Brazilian sample showed a bacteriostatic activity while Bulgarian propolis had a bactericidal action. The main vegetal source of propolis in Botucatu, São Paulo State, Brazil, is *Baccharis dracunculifolia* DC., followed by *Eucalyptus citriodora* Hook and *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Bankova et al., 1999). The chemical analysis of the Brazilian propolis sample revealed that its main components are phenolic compounds (flavonoids, aromatic acids, benzopyranes), di- and triterpenes and essential oils, among others. Bud exudates of different poplar species are the main sources of propolis in the temperate zone areas, including Europe, and its main constituents appeared to be phenolics: flavonoids, aromatic acids and their esters.

432 R.O. Orsi et al.

Salmonella Typhi susceptibility to antibiotics is variable, depending on the serovar and the resistance to antibiotic substances (Boonmar et al., 1998). Threlfall (2002) related that *S. Typhi* serovars, isolated in India and southwest of Asia, were resistant to several antimicrobial drugs, showing a high level of epidemic in these regions. Our data showed that the three antimicrobial drugs inhibited *S. Typhi* growth, showing a bactericidal effect. In order to verify a possible synergistic effect between propolis and antibiotics, we used the $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of the MIC of propolis samples and the antibiotics.

Chloramphenicol is effective against a wide variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including most anaerobic organisms. It inhibits protein synthesis by binding to the subunit 50S of the bacterial ribosome. The combination of $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of the MIC of Brazilian propolis and chloramphenicol led to a bacteriostatic activity, and the relation $\frac{1}{2}$ of the MIC was more efficient than $\frac{1}{4}$ of the MIC. As to Bulgarian propolis, a bactericidal effect was seen using $\frac{1}{2}$ of propolis and chloramphenicol after 9 h of incubation, while $\frac{1}{4}$ of the MICs had only a bacteriostatic action ($p < 0.001$) (Figure 1).

Tetracycline is a protein synthesis inhibitor by binding reversibly to the small ribosomal subunit 30S. With regards to tetracycline, one may observe that $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of Brazilian propolis did not reduce the CFU of *S. Typhi* (Figure 2), showing a bacteriostatic effect. On the other hand, Bulgarian propolis reduced the CFU, showing a bactericidal effect for both relations ($\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$) after 6 and 24 h of incubation, respectively ($p < 0.001$) (Figure 2). Krol et al. (1993) observed a moderate synergistic effect between propolis and tetracycline against *S. aureus*.

Neomycin also interferes with bacterial protein synthesis by binding to the subunit 30S as well. The combination of neomycin and Brazilian propolis did not reduce remarkably the CFU of *S. Typhi*, although the number of CFU mL⁻¹ was smaller compared to control ($p < 0.001$). With respect to Bulgarian propolis, there was also a synergistic effect with neomycin, and a bactericidal effect was seen after 1.5 h ($\frac{1}{2}$) and a bacteriostatic action after 24 h of incubation ($\frac{1}{4}$) ($p < 0.001$) (Figure 3).

The mechanism of action of the antibiotics acting on the protein synthesis is due to the interference on the bacterial ribosome (Silva, 1998; Skinner, Cundliffe, & Schmidt, 1983). Such antibiotics need to cross the bacteria wall and penetrate into the cytoplasm to exert their antibacterial effects (Silva, 1998). Takaisi-Kikuni and Schilder (1994) verified that the ethanolic extract of propolis acted on *S. agalactiae* growth, inhibiting the protein synthesis. Some components present in propolis extract probably act on the microbial membrane or cell wall site, causing functional and structural damages (Scazzocchio et al., 2006). Mirzoeva, Grishanin, and Calder (1997) verified that the ethanolic extract of propolis and some isolated compounds affect bacteria membrane potential and promote the immobilisation of *Bacillus subtilis*. One may speculate that propolis could act on the bacteria wall, favouring the entrance of these antibiotics inside the cell and affecting the bacterial protein synthesis.

In our study, Brazilian propolis showed a weak synergistic effect with the three antibiotics acting on the ribosome, showing just a bacteriostatic activity, while Bulgarian propolis had an efficient bactericidal effect *in vitro*. This finding may be explained by the differences in the chemical composition of such samples, which may change according to the local flora. Moreover, propolis action is a consequence of the combined action of several compounds (Santos et al., 2002). Data from the synergistic action of propolis with antimicrobial agents demonstrated its potential to enhance antibiotics action, which motivates researchers' interest and further

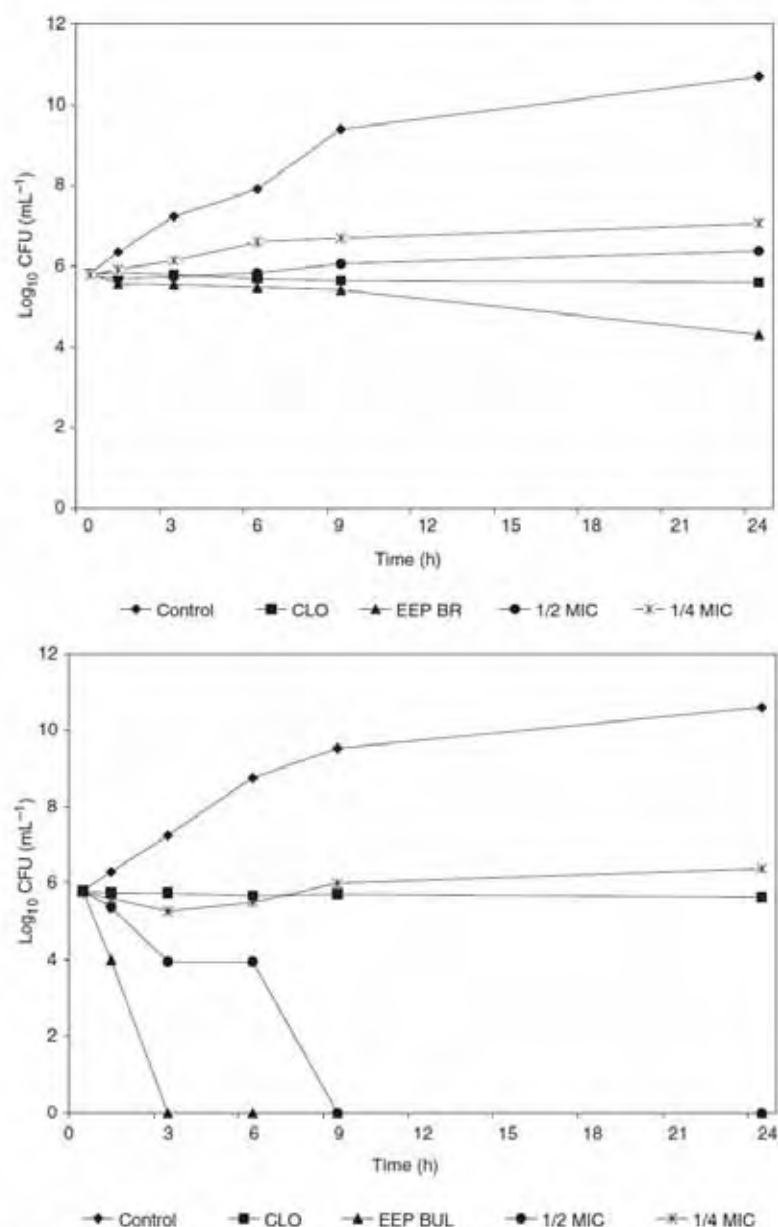


Figure 1. Profile in time (h) of the population analysis of *S. enterica* according to the susceptibility to Brazilian ethanolic extract of propolis (EEP BR – MIC = 9.9%), Bulgarian propolis (EEP BUL – 10.0%) and chloramphenicol (CLO – $8.0 \mu\text{g mL}^{-1}$), with $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of the MICs.

laboratory and clinical trials for evaluating the use of propolis preparations for prophylaxis or treatment of bacterial infections *in vivo*.

3. Experimental

3.1. Brazilian and Bulgarian propolis samples

Propolis was produced by Africanised bees and collected in the apiary of the University (Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus of Botucatu, Brazil). Bulgarian propolis was kindly given by Dr Vassya Bankova (Bulgarian Academy of Sciences).

434 R.O. Orsi et al.

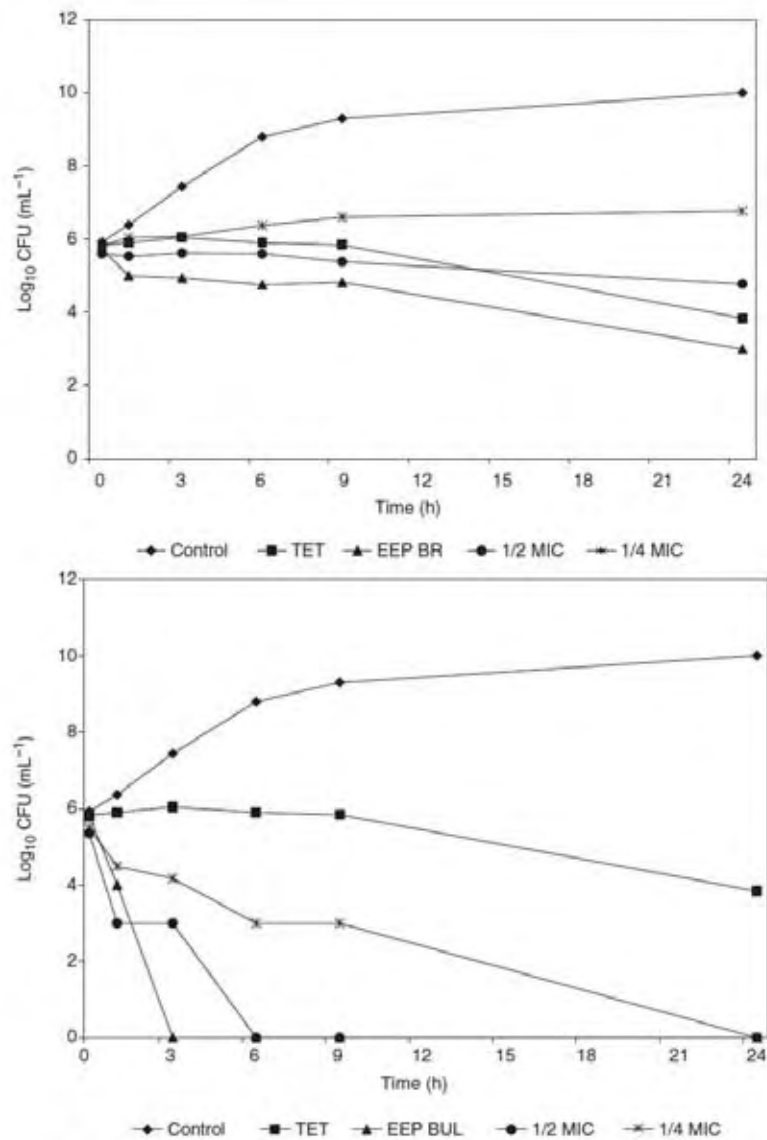


Figure 2. Profile in time (h) of the population analysis of *S. enterica* according to the susceptibility to Brazilian ethanolic extract of propolis (EEP BR – MIC = 9.9%), Bulgarian propolis (EEP BUL – 10.0%) and tetracycline (TET – 2.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), with $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of the MICs.

Propolis samples (30 g) were ground and extracted with 70% ethanol, completing the volume to 100 mL. After a week, extracts were filtered and an aliquot of 2 mL of each sample was weighed and incubated at 37°C. After evaporation of the solvent, the final concentrations were calculated, obtaining the dry weight per mL of the solutions (Brazil: 133 mg mL^{-1} ; Bulgaria: 170 mg mL^{-1}). Specific dilutions of these solutions were prepared in an appropriate media for each assay.

3.2. *Salmonella Typhi*

Salmonella Typhi standard serovar (00238) was obtained from the Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, and maintained in tripticase soya agar (TSA – Oxoid) at room temperature.

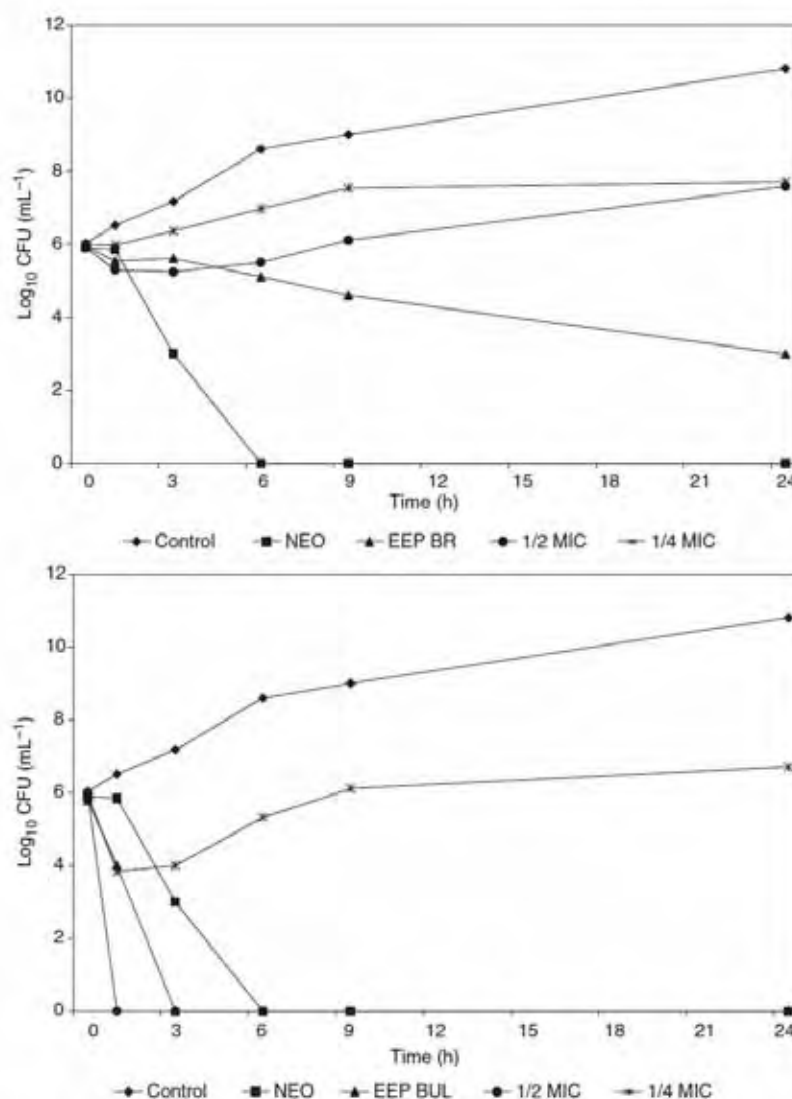


Figure 3. Profile in time (h) of the population analysis of *S. enterica* according to the susceptibility to Brazilian ethanolic extract of propolis (EEP BR – MIC = 9.9%), Bulgarian propolis (EEP BUL – 10.0%) and neomycin (NEO – 256.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), with $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of the MICs.

3.3. Susceptibility test to propolis

Serial concentrations of Brazilian and Bulgarian propolis were achieved in plates containing Mueller Hinton Agar, ranging from 1.0% to 14.0% v/v. Each antimicrobial test also included plates containing the culture medium plus 70% ethanol, in order to control a possible antimicrobial effect of propolis solvent.

Salmonella Typhi was grown in Brain Heart Infusion (BHI – Oxoid) agar at 37°C per 24 h. After incubation, the bacteria were suspended in 5 mL of sterile saline and diluted to yield a final inoculum of approximately 1.0×10^6 CFU mL⁻¹ (colony forming unit, CFU).

After the inoculation procedures using a multiloop replicator, plates were incubated at 37°C per 24 h and the determination of the MICs by the agar dilution method was performed, following the National Committee of Clinical Laboratory

436 R.O. Orsi et al.

Standards (NCCLS, 1997) Guidelines. MIC endpoints were read as the lowest concentration of propolis that resulted in no visible growth or haze on the surface of the culture medium. Population analysis of data was carried out by calculating the MIC for 90% of the microorganism (Sforzin et al., 2000).

3.4. Susceptibility test to antibiotics acting on the ribosome

The following antibiotics acting on ribosome were used: chloramphenicol, tetracycline and neomycin (Sigma, USA). These drugs were dissolved prior to their use and filtered through a 0.22 µm filter into vacuumed sterile pre-sealed vials, in order to obtain sterile solutions.

The MIC of such antibiotics was determined by serial dilutions in BHI, ranging from 0.008 to 1024.0 µg mL⁻¹. Aliquots (20 µL) of bacterial suspensions (1.0×10^6 CFU mL⁻¹) of *S. Typhi* were added to tubes containing BHI (2.5 mL) plus the antibiotics. Test tubes were incubated for 24 h at 37°C and MIC endpoints were read as the lowest concentration of antibiotics that resulted in no haze. All assays were carried out in triplicates.

3.5. Survival curve and synergistic effects of propolis and antibiotics

The survival curve of *S. Typhi* was performed in order to observe the incubation period responsible for propolis antibacterial activity. Thus, 1.0×10^6 CFU mL⁻¹ were inoculated in BHI containing the MIC 90% of propolis, obtained previously.

After 1.5, 3, 6, 9 and 24 h of incubation (37°C), aliquots of each culture were recovered and plated on Mueller Hinton agar by the Pour Plate method. Plates were counted (CFU mL⁻¹) after 24 h incubation and the survival percentage was calculated (Sforzin et al., 2000).

A synergistic effect between propolis and antibiotics was evaluated after 1.5, 3, 6, 9 and 24 h of incubation of *S. Typhi* with ½ or ¼ of Brazilian or Bulgarian propolis (MIC 90%) plus ½ or ¼ of each antibiotic.

3.6. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to examine the treatment effects in the survival curve, according to the incubation period in medium plus Brazilian or Bulgarian propolis and antibiotics. The probability of 0.05 was chosen as the significant level.

References

- Al-Aqeedi, R.F., Cama, A., Al-Aani, F.K., & Al-Ani, A.A. (2009). *Salmonella* myocarditis in a young adult patient presenting with acute pulmonary edema, rhabdomyolysis, and multi-organ failure. *Journal of Cardiology*, 54, 475–479.
- Bankova, V., Boudourova-Krasteva, G., Sforzin, J.M., Frete, X., Kujumgiev, A., Maimoni-Rodella, R., & Popov, S. (1999). Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54c, 401–405.
- Boonmar, S., Bangtrakulnonth, A., Pornruangwong, S., Samornsuk, S.B., Kaneko, K., & Ogawa, M. (1998). Significant increase in the antibiotic resistance of *Salmonella*

- isolates from human beings and chicken meat in Thailand. *Veterinary Microbiology*, *62*, 73–80.
- Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., De Sousa, J.P.B., Candeias, J.M., Bastos, J.K., & Sforcin, J.M. (2009). Antiviral activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis and poliovirus quantification by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, *107*, 1669–1680.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M., & Guimarães, S. (2006). *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, *13*, 170–175.
- Ghenghesh, K.S., Franka, E., Tawil, K., Wasfy, M.O., Ahmed, S.F., Rubino, S., & Klena, J.D. (2009). Enteric fever in Mediterranean north Africa. *Journal of Infection in Developing Countries*, *3*, 753–761.
- Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsz, G., & Zcuba, Z. (1993). Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Drug Research*, *43*, 607–609.
- Lewin, C.E. (1991). Treatment of multiresistant *Salmonella* infection. *The Lancet*, *337*, 47.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, P.C., & Calder, P.C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, *152*, 239–246.
- National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1997). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A*. Villanova, PA: NCCLS.
- Orsi, R.O., Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., Fernandes Jr, A., & Bankova, V. (2006). Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella* Typhi. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*, 108–112.
- Poppe, C., Aryoud, M., Ollis, G., Chirino-Trejo, M., Smart, N., Quessy, S., & Michel, P. (2001). Trends in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from animals, foods of animal origin, and the environment of animal production in Canada, 1994–1997. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, *7*, 197–212.
- Santos, F.A., Bastos, E.M.A., Uzeda, M., Carvalho, M.A.R., Farias, L.M., Moreira, E.S.A., & Braga, F.C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, *80*, 1–7.
- Scazzocchio, F., D'Auria, F.D., Alessandrini, D., & Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, *161*, 327–333.
- Scheller, S., Dworniczak, S., Klimmek, K.W., Rajca, M., Tomczyk, A., & Shani, J. (1999). Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of Mycobacteria. *Zeitschrift fur Naturforschung*, *54*, 549–553.
- Sforcin, J.M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, *113*, 1–14.
- Sforcin, J.M., Fernandes Jr, A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., & Funari, S.R.C. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, *73*, 243–249.
- Sforcin, J.M., Fernandes Jr, A., Lopes, C.A.M., Funari, S.R.C., & Bankova, V. (2001). Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *The Journal of Venomous Animals and Toxins*, *7*, 139–144.
- Silva, J. (1998). Mechanisms of antibiotic resistance. *Current Therapeutic Research*, *57*, 30–35.
- Skinner, R., Cundliffe, E., & Schmidt, F.J. (1983). Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and others antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, *258*, 12702–12706.
- Takaisi-Kikuni, N.B., & Schilder, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, *60*, 222–227.
- Threlfall, E.J. (2002). Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*, 141–148.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ESTUDOS COM PRÓPOLIS

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S.H. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian própolis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.58, p.945-946, 1994.

AMIOT, M.J., AUBERT, S., GONNET, M., TACCHINI, M. The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification. *Apidologie*, v.20, p.115-125, 1989.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against *Herpes simplex* virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of própolis. *Journal of Natural Products*, v.55, p. 1732–1740, 1992.

AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Comparison of the anti-*Herpes simplex* virus activities of própolis and 3-methyl-butyl-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*, v. 57, p. 644–647, 1994.

ANDRADE, P.; FERRERES, F.; AMARAL, M.T., Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatographic and Related Technologies*, v. 21, p. 4-12, 1997.

ÂNGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos e alimentos- Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.66, p. 1-9, 2007.

ANGERAMI, S. Cuba descobre novos efeitos terapêuticos da própolis. *Revista Brasileira de Apicultura*, Maio/Junho, p.18-20, 1991.

AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; BESER, L. B. de O.; COSTA, V. C. S.; SILVA, V. A. G. Características físico-químicas de amostras de méis de

- melíponas coletadas no Estado de Tocantins. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 2000, Florianópolis SC Anais... Florianópolis SC. 2000. (CD).
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian própolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v.50,p.167-172, 1995.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of própolis and the problem of stardandization. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 114-147, 2005.
- BECKEMEIER, H.; BRAUN, W.; FRIEDRICH, E. Mikrobiologische, pharmakologische und klinische untersuchungen zur Wirksamkeit von própolis (Microbiological, pharmacological and clinical studies on the efficiency of própolis). *Dermatologische. Monatsschrift*, v.159, p.443-449, 1973.
- BIESMEIJER, J.C. Abejas sin aguijón: su biología y la organización de la colmena. Elinkwijk BV. Utrecht, The Netherlands, 1997, 77pp.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (própolis). *Food and Chemical Toxicology*, v.36, p. 347-363, 1998.
- CAMARGO, R.C.R. Biologia floral de *Lippia alba* (Verbenaceae), atividade antibacteriana e caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 2001, 99f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.
- CARVALHO, C.A.L.; MARCHINI, L.C. Plantas visitadas por *Apis mellifera* L. no vale do rio Paraguaçu, Município de Castro Alves, Bahia. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v.22, p.333-338, 1999.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Própolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, v.73, p.1-6, 2002.

- CHERNYAK , N.F. On synergistic effect of própolis and some antibacterial drugs. *Antibiotic*, v.8, p.259-61, 1973.
- COLOMBARI, V. *Estudo da atividade antibacteriana da própolis em função do modo de preparo do extrato alcoólico*. 1997, 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas-Modalidade Bacharelado)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.
- COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. *Apicultura: Manejo e produção. Jaboticabal: FUNEP*, 1996, 154p.
- CUETO, D.J. Experiencia clinica de los medicamentos elaborados com propoleo. In: TALLER INTERNACIONAL SOBRE APITERAPEUTICOS, 1, SIMPOSIO DE APITERAPIA, 2, SIMPOSIO SOBRE PROPELEOS, 3, 1991, Havana. Programa/Resumenes..., Havana, SCP, 1991, p.259-62.
- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.26, p.343–356, 2005.
- DEREVICI, A.; POPESCU, A. L'action "in vitro" de la própolis surles cellules de la tumeur accitique chrlich. *Bulletin Apiculture*, v.8, p.41-53, 1965.
- DETOMA, P.; OZINO, O.I. Azione della propoli su microrganismi dell'ambiente ospedaliero. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, v.41, p.231-236, 1991.
- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V.; NIKOLOV, N.; POPOV, S. Immunomodulatory action of própolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*, v.22, p. 155–162, 1991.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, M. A. F.; DORNELLAS, G. S.; RODRIGUES, M. L.. Estudo de plantas visitadas por abelhas *Melipona scutellaris* na microrregião do brejo no Estado da Paraíba. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 25, p. 229-234, 2003.

- FERNANDES JÚNIOR, A.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A.M. *In vitro* activity of própolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 1, p. 63-65, 1995.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C.A.M.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Population analysis of susceptibility to própolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 3, p.287-294, 1997.
- FERNANDES JÚNIOR, A; BALESTRIN, E.C.D.; CUNHA M.R.L.S. Anti *Staphylococcus aureus* activity of bee própolis extracts prepared with different ethanol concentrations. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.24, p. 147-152, 2003.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* própolis from three regions of Brazil. *Ciência Rural*, v.36, p.294-297, 2006.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E.C.; BETONI, J.E.C.; ORSI, R.O.; CUNHA, M.L.R.S.; MONTELLI, A.C. Própolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 563-566, 2005.
- FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERAN, F.A.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids of “La Alcarria” honey. A study of their botanical origin. *Zeitschrift fur Lebensmittel – Untersuchung und Forschung*. v.194, p.139-143, 1992.
- FRENKEL, K.; WEI, H.; BHIMANI, R.; YE, J.; ZADUNAISKY, J.A.; FERRARO, T.; CONNEY, A.H.; GRUNBERGER, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Research* , 53, p. 1255–1261, 1993.

- FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26,p. 171-178, 2006.
- GHISALBERT, E.L. Própolis: a review. *Bee World*, v.60, p.59-84, 1979.
- GONZALES, R.; CORCHO, I.; REMIREZ, D.; RODRIGUEZ, S.; ANCHETA, O.; MERINO, N.; GONZALES, A.; PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of própolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytotherapy Research*, v.9, p. 114–117, 1995.
- GONSALES, G.Z.; ORSI, R.O.; FERNANDES JÚNIOR, A.; RODRIGUES, P.; FUNARI, S.R.C. Antibacterial activity os própolis collected in different regions os Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.12, p. 276-284, 2006.
- GREENAWAY, W.; SCAYBROOK, T.; WHATLWY, F.R.; The composition and plant origins of própolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, v.71, p.107-118, 1990.
- GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.;WHATLEY, F.R., 1991. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in própolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.46, p. 111-121, 1991.
- HALAWANI, E.M.; SHOHAYEB, M.M. Shaoka and Sidr Honeys surpass in their antibacterial activity local and imported honeys available in Saudi markets against pathogenic and food spoilage bacteria. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 5, p: 187-191, 2011
- ISLA, M.I.; MORENO, M.I.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Antioxidant activity of Argentina própolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 165–170, 2001.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V. A. *Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação*. Belo Horizonte: Acangaú, 1996. 143p.

- KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C.& MORETI, A.C.C. C.. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteína. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, p. 143-146, 2002..
- KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of própolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel - Forschung*, v.43, p.607-609, 1993.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of própolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, v.84, p.329-339, 2004.
- LAVIE, P. El antibioticos del propoleos. In: INTERNATIONAL BEEKEEP JUBILEE CONGRESS, 1975, Bucharest. Anais. Bucharest: APIMONDIA, 1975, p.145-56.
- LEVY JÚNIOR, N. C. *Atividade antimicrobiana de méis e própolis de Apis mellifera e Meliponinae Brasileiros*. 1997. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.
- LINDENFELSER, L.A. Antimicrobial activity of própolis. *American Bee Journal*, v.107, p. 90-92, 1967.
- MANTOVANI, R.P.; RALL, V.L.M.; BATALHA, J.E.N.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JÚNIOR, A. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of própolis from two Brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by E-Test method. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.14, p.357-365, 2008
- MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P. Análise de agrupamento com base na composição físico química de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, p. 8-17, 2005

- MARCUCCI, M.C. Zootécni: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v.26, p.83-99, 1995.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian própolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p. 105-112, 2001.
- MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, p.405-411, 2005.
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of própolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese própolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 20, p. 496–501, 1997.
- MOCHIDA, S.; HAGA, M.; TAKINO, Y. Chemical constituents and antimicrobial activity of Japanese própolis. Apimondia. In: The XXXth International Apicultural Congress, Nagoya-Japan. pp. 455–456, 1985.
- MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, v.73, p.5-28, 1992.
- MURAD, J.M.; CALVI, S.A.; SOARES, A.M.V.C.; BANKOVA,V.; SFORCIN, J.M.. Effect of própolis from Brazil and Bulgaria on fungucidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.79, p. 331–334, 2002.
- NOGUEIRA NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas em ferrão. São Paulo: Editora Nogueirapis. 1997. 446p.

- ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES JÚNIOR, A.; BANKOVA, V. Sinergistic effect of própolis and antibiotic on the *Salmonella* Typhi. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.108-112, 2006.
- ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C.; FERNANDES JÚNIOR, A.; RODRIGUES, P.; BANKOVA, V. Effects of própolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 13, p. 748-757, 2007.
- ORSI, R.O.; FERNANDES JÚNIOR, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian própolis and synergistic effects with antibiotics acting on the bacterial DNA and folic acid. *Natural Product Research*, v.26, p. 344-349, 2012.
- ORSI, R.O.; FERNANDES JÚNIOR, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian própolis in vitro against *Salmonella* Typhi and synergism with antibiotics on the ribosome. *Natural Product Research*, v.26, p. 430-437, 2012.
- PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p. 102-107, 2007.
- PAINTZ, M.; METZNER, J. Zur lokalanasthetischen wirkung von própolis und einigen inhaltsstoffen. *Pharmazie*, v.34, p. 839–841, 1979.
- PAMPLONA, B.C. *Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de Apis mellifera e suas relações físico-biológicas*. 1989. 131p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo,.1989.
- PEPELJNJAK, S.; JALSENJAK, I.; MAYSINGER, D. Flavonoid content in própolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, v.40, p. 122–123, 1985.

- PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, v. 25, p. 321-326, 2002.
- 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
- PROBST, I.S.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JÚNIOR A. Antimicrobial activity of própolis and essential oils and synergism between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease*. v.17, p. 159-167, 2011.
- SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Própolis. *Oxford Journals, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2, p. 33-38, 2005.
- SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.S.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; PEDRO H. CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. Brazilian própolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Oxford Journals, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.5, p. 317–324, 2008.
- SHELLER, S.; ROGALA, D.; STASIAK, E. Antibacterial properties of própolis. *Polskie Achiwum Weterynaryjne*, v.11, p.391-98, 1968.
- SCHNEIDEWIND, E.M.; BUGE, A.; KALA, H.; METZNER, J.; ZSCHUNKE, A. Identification of an antimicrobially active constituent isolated from própolis. *Pharmazie*, v.34, p. 103–106, 1979.
- SFORCIN, J.M.; FERNANDES JÚNIOR., A.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect on Brazilian própolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, p.243-249, 2000.

- SFORCIN, J.M.; FERNANDES JÚNIOR., A.; LOPES, C.A.M, FUNARI, S.R. ; BANKOVA, V.; Seasonal effect of Brazilian própolis on *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.7, p. 139-144, 2001.
- SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Própolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* , v.33, p. 253–260, 2011.
- SILVA, R.A.; RODRIGUES, A.E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO, A.R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural* , vol.36, p. 1842-1848, 2006.
- SILICI, S.; KUTLUCA. S. Chemical composition and antibacterial activity of própolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.69-73, 2005.
- SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos micro-organismos presentes na saliva de humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 84-89, 2008.
- SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai*. *Ciência Rural*, v.34, p. 1623-1624, 2004.
- STEPANOVIC, S., ANTIC, N.; DAKIC, I.; SVABIC-VLAHOVIC, M. *In vitro* antimicrobial activity of própolis and synergism between própolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, v. 158, p. 353-357, 2003 ,
- STREHL, E.; VOLPERT, R.; ELSTNER, E.F. Biochemical activities of própolis extracts. III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Zeitschrift für Naturforschung* v.49c, p. 39–43, 1994.

- SUCHY, H.; SCHELLER, S. Resultados del empleo del propoleos en ginecologia. In: INTERNATIONAL BEKEEP JUBILEE CONGRESS, 1975, Bucharest. Anais, Bucharest: Apimondia. 1975, p.138.
- SUN, F.; HAYAMI, S.; HARUNA, S.; OGIRI, Y.; TANAKA, K.; YAMADA, Y.; IKEDA, K.; YAMADA, H.; SUGIMOTO, H.; KAWAI, N.; KOJO, S. *In vivo* antioxidative activity of própolis evaluated by the interaction with vitamin C and vitamin E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p. 1462–1465, 2000.
- TAVARES, J.P.; MARTINS, I.L.; VIEIRA, A.S.; LIMA, F.A.V.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, p. 350-356, 2006.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids in honey of different geographical origin. *Zeitschrift fur Lebensmittel–Untersuchung und Forschung*, v. 196, p.38-44, 1993.
- TOSI, E.A.; RÉ E.; ORTEGA, M. E.; GAZZOLI, A.F. Food preservative based on própolis: Bacteriostatic activity of própolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1025-1029, 2007.
- TREVISAN, M.D.P. Própolis. *Informe Agropecuário*. Belo Horizonte, v.9, p.50-52, 1983.
- TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian red própolis, *eCAM*, v.3, p. 249–254, 2006.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian própolis of native stingless bees. *Fitoterapia*, v.71, p. 693–696, 2000.

WAHDAN, H.A.L. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection*, v.26, p.30–35, 1998.

WESTON, R.J.; BROCKLEBANK, K.L.; LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*, v.70, p. 427-435, 2000.

WIESE, H. *Apicultura*. Novos tempos, 2.ed.. Guaíba: Agrolivros, 2005, 378p.

5. PLANTAS MEDICINAIS E AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS SEUS PRODUTOS DERIVADOS

5.1. Aspectos gerais sobre plantas medicinais.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA JÚNIOR et al., 2005). Além disto, pode-se considerar como planta medicinal aquela que quando administrada sob qualquer forma, e por alguma via, ao homem exerce algum tipo de ação farmacológica. As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se por aquelas empregadas diretamente na terapêutica, seguido das que se constituem matéria-prima para manipulação e as empregadas na indústria objetivando a obtenção de princípios ativos ou precursores em semi-síntese. As plantas medicinais também têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades com aplicação ampla que abrange desde o combate ao câncer a inibidores do crescimento de micro-organismos patogênicos ao homem e animais (CALIXTO, 2000; SILVA & CARVALHO, 2004).

Outra abordagem possível também é que as plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita para algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O conjunto de compostos secundários - substâncias que geralmente não estão envolvidas em funções vitais das plantas, geralmente não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas muito variadas e às vezes bem complexa nas plantas - é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado tanto por fatores genéticos, portanto fixos, e os ambientais, a exemplo de luminosidade, temperatura, tipo de solo, disponibilidade de água, além de outros, que também são variáveis ou sazonais. Esses compostos desempenham funções importantes nos vegetais, uma vez que são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas. Por outro lado, esses compostos ao serem incorporados pelo organismo animal, produzem efeitos variados sobre a fisiologia destes e, quando benéficos, caracterizam estas plantas

que os possuem como plantas medicinais. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em micro-organismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (REINBOTHE et al., 1990)

Segundo Gobbo Netto & Lopes (2007) inúmeros são os fatores ambientais com capacidade de influenciar a quantidade e qualidade dos compostos secundários das plantas (Figura 1).

As plantas medicinais representam também um importante recurso terapêutico, sendo que no passado com frequência representavam o principal recurso terapêutico conhecido, revelando que o uso das plantas medicinais representa um dos traços mais característicos da espécie humana e por isto, conhecido desde a antiguidade. É possível acrescentar que esta pratica é tão antiga quanto o *Homo sapiens* e observada em praticamente todas as civilizações ou grupos culturais conhecidos (ALMEIDA et al., 2008).

É estimado que exista na Terra entre 350.000 a 550.000 espécies de plantas e que para a grande maioria não existem estudos químicos, analíticos e farmacológicos, embora muitas espécies sejam utilizadas de forma empírica na medicina popular, sem qualquer respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Em todo o mundo, algo em torno de 17% das plantas já foi estudado de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Assim, estas informações mostram o enorme potencial das plantas quanto a descoberta de novos fitomedicamentos (HAMBURGUER et al., 1991; MONTARI, 1995; CRAGG et al., 1999) bem como isto representa um fator de incentivo aos estudos com plantas, objetivando a sua utilização como fonte de recursos terapêuticos e por ser um vasto celeiro de biomoléculas ainda por serem descobertas (FOGLIO et al., 2006).

A utilização, bem como a comercialização, de plantas medicinais é amplamente realizada nas diferentes regiões do Brasil, estando estas práticas relacionadas com os aspectos sociais, econômicos, culturais e mais recentemente os ecológicos.

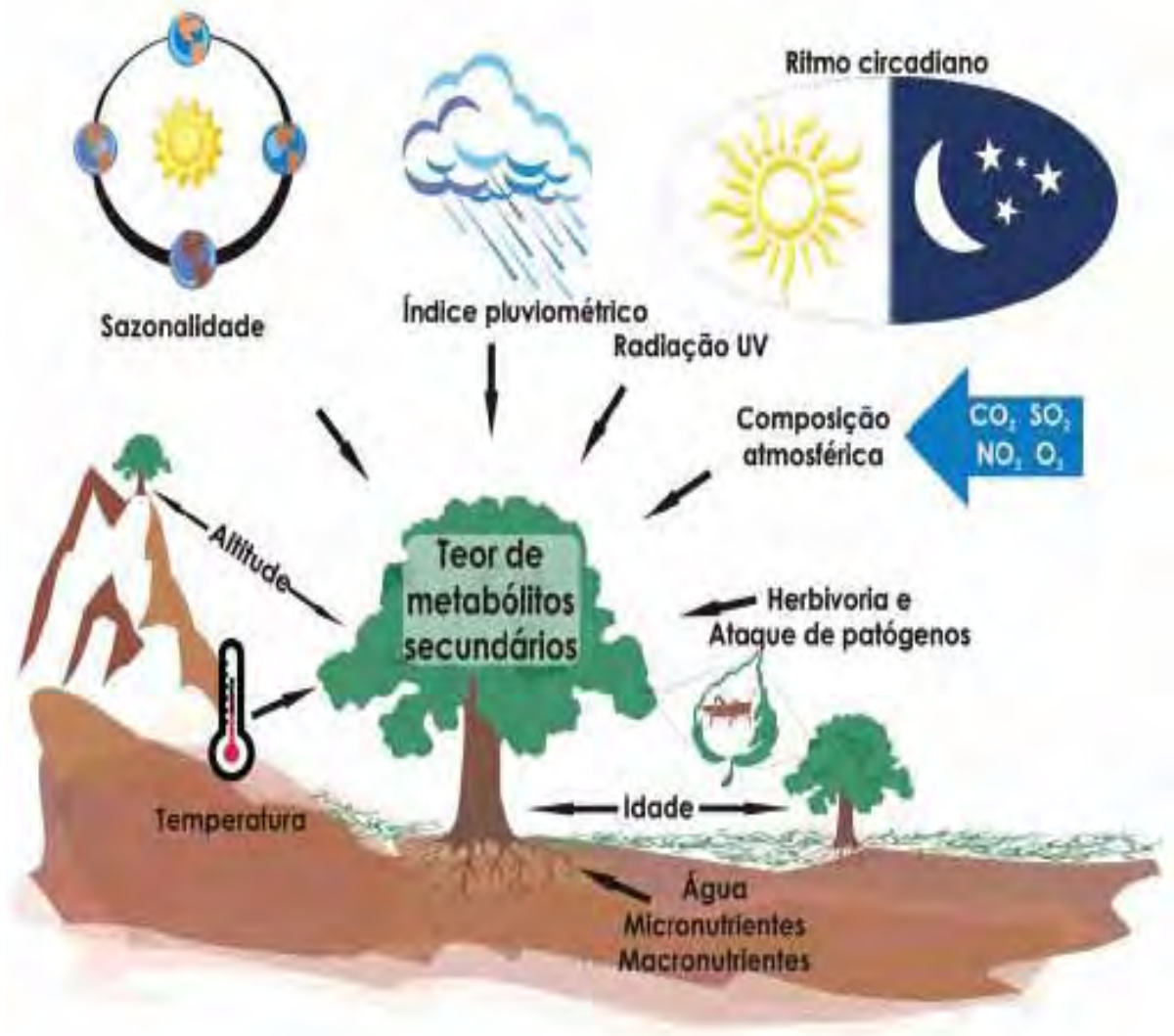


Figura 1. Ilustração dos principais fatores que influenciam o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas (Fonte-GOBBO NETTO & LOPES, 2007).

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado em 20% do número total de espécies do planeta, sendo este um número superior a 55 mil espécies descritas. Esta rica biodiversidade é acompanhada também pela grande aceitação do uso de plantas medicinais e do conhecimento tradicional associado. Atualmente, aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica têm origem direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (CARVALHO et al., 2007).

Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos como, por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis*, usados para insuficiência cardíaca. Países como China e Índia têm encontrado meios de legalizar e reconhecer o uso tradicional das plantas. A cultura chinesa utiliza o conhecimento popular das ervas há cinco séculos, com mais de cinco mil espécies utilizadas (FOGLIO et al., 2006). Relataram ainda os autores que no Brasil 20% da população consomem 63 % dos medicamentos alopáticos e o restante encontram nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação.

O interesse sobre pesquisas nesta área tem aumentado nos últimos anos com inúmeros projetos financiados tanto por órgãos públicos como privados. Nos anos 70, nenhuma das grandes empresas mundiais do ramo de medicamentos mantinha programas de pesquisa nesta linha enquanto nos dias atuais isto tem se mostrado uma prioridade na maioria delas. Dentre os fatores que também têm contribuído para um aumento nas pesquisas com plantas é a comprovação da eficácia de inúmeras substâncias originadas de espécies vegetais, a exemplo dos alcalóides da vinca, com atividade antileucêmica; do jaborandi, com atividade antiglaucoma, ambos ainda considerados indispensáveis para os respectivos tratamentos.

Também deve ser considerado que com a difusão dos conhecimentos sobre plantas medicinais, as indústrias vêm elaborando produtos a base de espécies vegetais sob variadas formas farmacêuticas, sendo portanto já comercializados em farmácias ou ainda em casas de produtos naturais. No entanto, não há garantia para a grande maioria destes produtos, quanto à sua eficácia, segurança e qualidade, podendo inclusive oferecer riscos à saúde dos consumidores, embora a ANVISA já tenha regulamentado que plantas para preparo

de chás devam ser vendidos como alimentos. Assim, torna-se importante o estabelecimento de protocolos padronizados de controle de qualidade para os produtos fitoterápicos (FONSECA & LIBRANDI, 2008) bem como normas de qualidade precisam ser definidas quanto ao processamento dos extratos e uma avaliação preliminar rigorosa baseado em modelos de *screening* farmacológicos adequados (COS et al., 2006).

Finalmente, a formação científica dos pesquisadores e a infra-estrutura dos laboratórios são adequadas para o desenvolvimento de pesquisa de qualidade na área. A maioria dos trabalhos está voltada para o isolamento e a identificação de substâncias, muitas vezes associada a ensaios biológicos ou mesmo estudos quimiotaxonômicos. Estas pesquisas resultaram em um número significativo de publicações em revistas indexadas nacionais e internacionais, além de contribuir expressivamente para a formação de recursos humanos na área de produtos naturais. Porém, algumas diferenças são observadas quando as pesquisas brasileiras com produtos naturais são comparadas com as desenvolvidas no exterior. Uma diferença está relacionada com a forte inserção dos produtos naturais na área biológica, fato que nas pesquisas brasileiras é observado quase que exclusivamente na busca de substâncias bioativas (PUPO & GALLO, 2008).

5.2. Aspectos gerais sobre os antimicrobianos vegetais.

As doenças infecciosas são causadas por bactérias, vírus, protozoários e fungos, e ocorrem devido a uma complexa interação entre o patógeno, o hospedeiro e o seu ambiente. O desenvolvimento da antibioticoterapia possibilitou a erradicação de inúmeras doenças que no passado devastaram populações humanas. Por outro lado, o uso abusivo e indiscriminado desta classe de medicamento possibilitou o surgimento dos chamados micro-organismos multirresistentes (HEMAISWARYA et al., 2008). Tais doenças ainda são uma ameaça para a saúde pública, apesar dos enormes progressos na medicina humana, sendo seu impacto particularmente acentuado nos países em desenvolvimento devido à indisponibilidade relativa dos medicamentos e à emergência de resistência às drogas (OKEKE et al., 2005). Assim, considero que a investigação sobre novas substâncias antimicrobianas deve ser continua bem

como todas as estratégias possíveis para resolver tal problema devem ser exploradas.

A resistência dos patógenos, isolados de humanos ou animais, aos antimicrobianos é um dos aspectos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como para os em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de drogas antimicrobianos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, tendo como consequência um sério problema de saúde pública. Além disto, são freqüentes também os relatos sobre o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas (DUARTE, 2006). Citam ainda os autores que grupos de pesquisadores têm relatado as atividades biológicas de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo orientadas sempre pelo uso popular para cada espécie. Por outro lado, os micro-organismos, especialmente os que causam prejuízos à saúde humana, estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que tem incentivado ainda mais as pesquisas por substâncias antimicrobianas de ocorrência natural.

Dentre os produtos antimicrobianos naturais, os óleos essenciais e extratos de plantas tem sido objeto de pesquisas nos últimos anos com finalidade de testar o uso potencial destes como antimicrobianos na terapêutica de doenças infecciosas (BURT, 2004; BENDAHOU et al., 2008; AL-REZA et al., 2010).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na fisiologia e comportamento das plantas. Os compostos voláteis presentes atuam como uma linguagem que as plantas utilizam para comunicação e interação com o ambiente circundante. Um total de 1700 compostos voláteis já foi isolado de mais de 90 famílias de plantas. Estes compostos, liberados a partir de folhas, flores e frutas para a atmosfera e de raízes no solo, tem como objetivo defender as plantas contra herbívoros e patógenos ou fornecer uma vantagem reprodutiva, atraindo polinizadores e dispersores de sementes. De maneira geral, os compostos voláteis de plantas constituem cerca de 1% de seus metabólitos secundários (DUDAREVA et al., 2006).

A composição química destes produtos vegetais é bastante variada e inclui diversas classes de compostos, tais como saponinas, flavonóides, tio-sulfatos,

glucosinolatos (TAJKARIMI et al., 2010), taninos, quinonas, alcalóides e ácidos orgânicos (TAN et al., 2007). Pesquisas recentes têm relacionado à atividade antimicrobiana de fontes naturais com a presença de uma classe de compostos abundante em espécies vegetais, os chamados compostos fenólicos (MAJHENIC et al., 2007; EL-MASSRY et al., 2009; MAIER et al., 2009).

Segundo Nascimento et al. (2007) e Martos et al. (2010), os óleos essenciais apresentam mais de 100 componentes, principalmente os polifenóis, terpenos, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que alguns podem representar mais de 85% do conteúdo total.

Partes aéreas de espécies vegetais, como ramos, folhas e flores, e partes subterrâneas, como tubérculos, rizomas e raízes, são freqüentemente utilizadas nas pesquisas por novos compostos (BENKEBLIA, 2004; AIDI WANNES et al., 2010) e o estudo de espécies utilizadas no preparo de infusões, tais como chás e outros tipos de bebidas, tem ganhado cada vez mais destaque (BASTOS et al., 2006; BAHORUN et al., 2010).

Considerando os órgãos produtores e/ou acumuladores dos metabólitos secundários, Marzoug et al. (2011) relataram em estudo sobre ação antimicrobiana de óleos essenciais de partes distintas da planta de eucalipto (*Eucalyptus oleosa*) (caule, folhas maduras e flores e frutos imaturos) que os respectivos óleos apresentaram ação antimicrobiana bem próximas, com uma ligeira maior eficiência para o óleo obtido com flores jovens da planta. Mencionam também uma relação entre a presença de monoterpenos oxigenados e ação antimicrobiana do óleo.

Esta busca por novos agentes antimicrobianos tem sido realizada normalmente por grupos de pesquisa envolvidos com a área de etnofarmacologia. Assim, Recio et al. (1989), em artigo sobre revisão de estudos relevantes sobre o assunto desenvolvidos no período compreendido entre 1978 e 1988, mencionam um total de 75 espécies microbianas testadas com relatos sobre atividade dos extratos vegetais, juntamente com o espectro de ação e os princípios ativos responsáveis por esta atividade. Esta revisão revelou também que os fenólicos foram os compostos ativos predominantes nas plantas estudadas e que bactérias Gram positivas foram os micro-organismos mais susceptíveis a estes compostos. Neste estudo foram mencionadas questões referentes às metodologias utilizadas para os ensaios de susceptibilidade *in vitro*, o que revelou também a existência de inúmeros resultados contraditórios obtidos entre grupos de pesquisas distintos.

Na tentativa de equacionar este problema, RIOS et al. (1988) publicaram uma revisão com finalidade de destacar os métodos experimentais utilizados, seja para verificação de atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais de plantas. A recomendação reportada neste estudo foi a da utilização de métodos de difusão, tanto para compostos polares de pequeno ou médio tamanho molecular, e para determinação do espectro de ação de compostos sobre micro-organismos susceptíveis. Por outro lado, a metodologia da diluição em agar foi a sugerida para os estudos com substâncias polares e não polares, bem como para extratos complexos de plantas. Este método, ou seja, a diluição em agar, mostrou-se especialmente adequado para a verificação do espectro de ação de extratos e óleos essenciais, uma vez que com esta técnica é possível testar diferentes linhagens numa mesma placa de Petri. Finalmente, foi sugerido o método de diluição em caldo por ser uma ótima metodologia quando se pretende estabelecer a potência real de um composto puro, embora a solubilidade do mesmo deva ser um requisito óbvio durante a utilização desta metodologia. Na Figura 2 são apresentadas fotos referentes a ensaios feitos em nosso laboratório utilizando metodologia da diluição em caldo, tanto a macrodiluição como microdiluição.

Kalemba & Kunicka (2003) apresentaram estudo de revisão sobre os métodos clássicos normalmente utilizados na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de óleos essenciais, incluindo os métodos de difusão em ágar, seja a partir de disco impregnados ou em cavidades no agar; de diluição, tanto em agar como em meio líquido, e aqueles que objetivam proceder o acompanhamento do crescimento microbiano utilizando métodos por turbidimetria (turvação do meio devido o crescimento microbiano).

Esses relatos anteriores reforçam os aspectos referentes aos fatores que podem influenciar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e os mecanismos envolvidos na ação inibidora, bem como fornecer uma visão geral da susceptibilidade das bactérias de origens humana e alimentar e fungos frente aos diferentes óleos essenciais e seus constituintes majoritários.

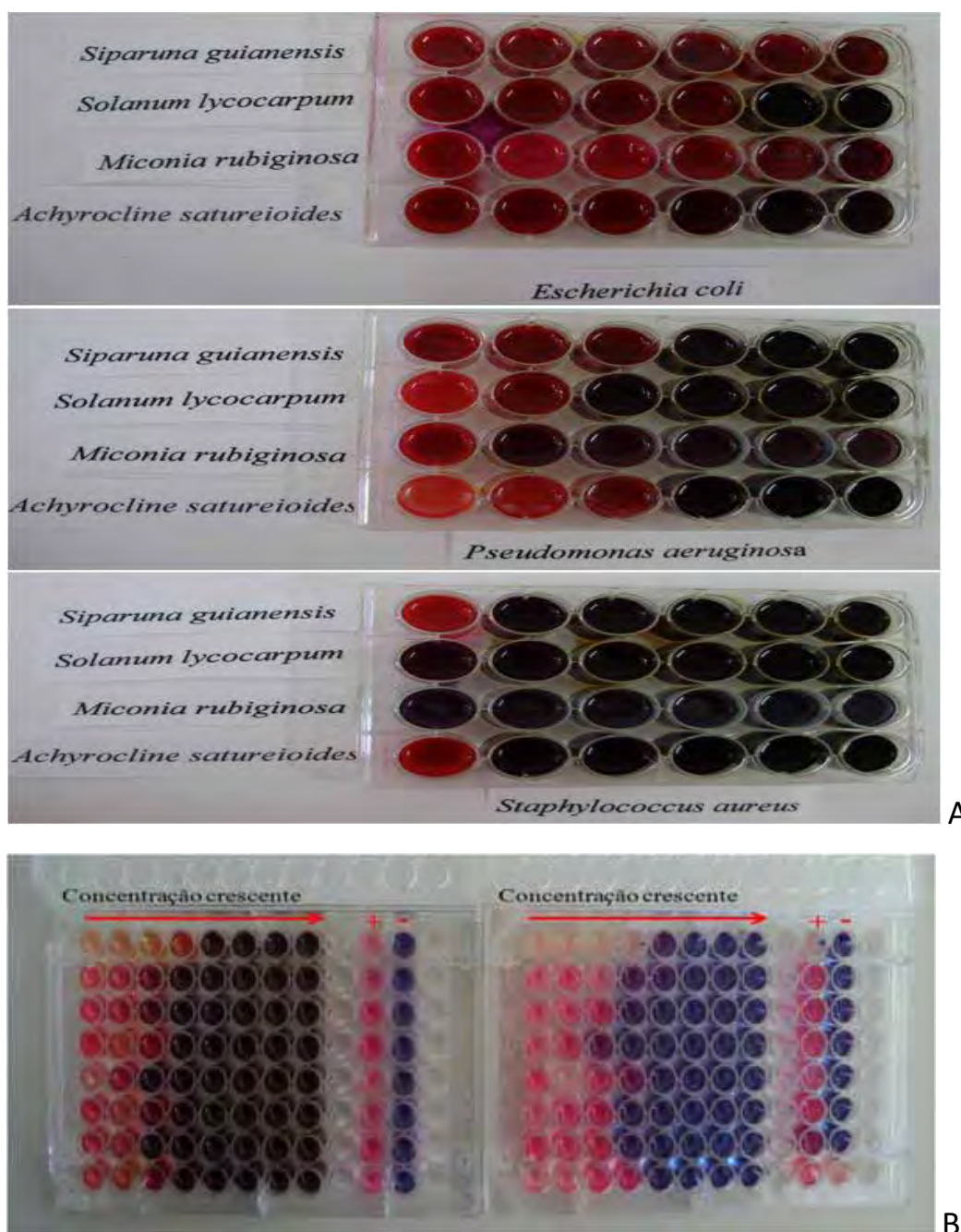


Figura 2. Fotos ilustrativas de ensaios de sensibilidade bacteriana pela a (A) macrodiluição realizada para quatro extratos de plantas em placas de 24 poços que substituíram os tubos de vidro; e (B) microdiluição em placas de 96 poços para um total de oito cepas bacterianas distintas frente a um óleo essencial. A cor observada deve-se ao acréscimo de resazurina para revelar crescimento bacteriano após 24 horas/37°C. (Fonte-ARY FERNANDES JÚNIOR).

Em levantamento bibliográfico mais recente sobre publicações na área de atividade antimicrobiana de plantas medicinais no PubMed, Rios & Recio (2005) reportaram que, comparativamente ao período entre 1966 e 1994 no qual foram estabelecidos 115 artigos publicados, na década entre 1995 e 2004, as publicações atingiram um número de 307. Considerando as pesquisas específicas sobre atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, relataram que foram detectadas 187 referências no PubMed entre 1971 e 2005, embora uma pesquisa realizada com os dados do ISI Web, o número de referências sobre óleos essenciais foi muito superior totalizando 323 entre os anos de 1986 e 2005. Portanto, verifica-se pelos números apresentados que há um interesse crescente pela comunidade científica pelos estudos das propriedades medicinais das plantas. Relataram ainda os autores que em relação ao futuro desta linha de pesquisa, algumas considerações gerais devem ser estabelecidas para os estudos de ação antimicrobiana de extratos vegetais, óleos essenciais e respectivos compostos isolados.

Como exemplos reportados, há necessidade de utilização de parâmetros comuns definidos, tais como a caracterização dos produtos derivados dos vegetais, a metodologia empregada para os ensaios microbiológicos, bem como o tipo de meio de cultura utilizado e micro-organismos testados nos ensaios. Além disto, critérios científicos devem ser utilizados durante a escolha do material vegetal, os quais devem seguir uma perspectiva etnofarmacológica como, por exemplo, uma descrição criteriosa sobre a realização da coleta da planta (local, estação do ano, data e hora do dia) e preparo dos extratos, sugerindo-se a preferência para a utilização de solventes que normalmente são utilizados no uso popular pelos usuários ou na fitoterapia.

Referente à época e local de coleta das amostras de plantas, Celiktas et al. (2007) realizaram estudo com finalidade de determinar a ação antimicrobiana de extratos metanólicos e óleos essenciais de amostras de *Rosmarinus officinalis* obtidas em três regiões distintas no mediterrâneo durante quatro diferentes épocas (Dezembro de 2003, março, junho e setembro de 2004). Os ensaios de atividade antimicrobiana (metodologias dos discos e microdiluição) dos extratos e dos óleos essenciais foram realizados utilizando linhagens padrões ATCC (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Proteus vulgaris* ATCC 6897, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,

Escherichia coli ATCC 11230, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Candida albicans* ATCC 10239). Os resultados mostraram que as bactérias foram mais sensíveis aos óleos essenciais e, parcialmente frente aos extratos metanólicos. O poder antimicrobiano dos óleos essenciais sobre as bactérias testadas foram também distintos de acordo com o local de coleta e variações sazonais.

Outro aspecto mencionado na literatura é que os compostos secundários de plantas têm mostrado ação inibidora maior sobre as bactérias Gram positivas quando comparadas as Gram negativas e leveduras (HEMAISWARYA et al., 2008). A explicação possível é que a presença de membrana externa na parede das Gram negativas representa uma barreira bastante eficaz à passagem de compostos hidrofóbicos e anfipáticos. Porém, alguns estudos também mostraram que Gram negativas foram mais susceptíveis que Gram positivas. A título de exemplo, Tassou et al. (1995) reportaram a maior eficiência de óleo essencial de *Mentha piperita* sobre linhagens de *Salmonella* Enteritidis que sobre *Listeria monocytogenes*. Outtara et al. (1997) reportaram não ter ocorrido diferenças de ação de alguns produtos antimicrobianos vegetais sobre Gram positivas e negativas quando o tempo de contato estabelecido era de 24 horas embora após 48 de contato a sensibilidade foi significativamente maior sobre a Gram negativa que para a Gram positiva.

Os locais, ou estruturas, da célula bacteriana que podem ser considerados sítios de ação para os componentes de produtos naturais são ilustrados na Figura 3. Geralmente os mecanismos de ação de compostos naturais são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios ser afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004). Segundo este autor, se considerarmos os inúmeros compostos ativos presentes nos produtos antimicrobianos naturais, é razoável atribuir a ação antimicrobiana dos mesmos a uma somatória de efeitos que ocorrem concomitantemente, ou seja, vários mecanismos de ação atuando ao mesmo tempo.

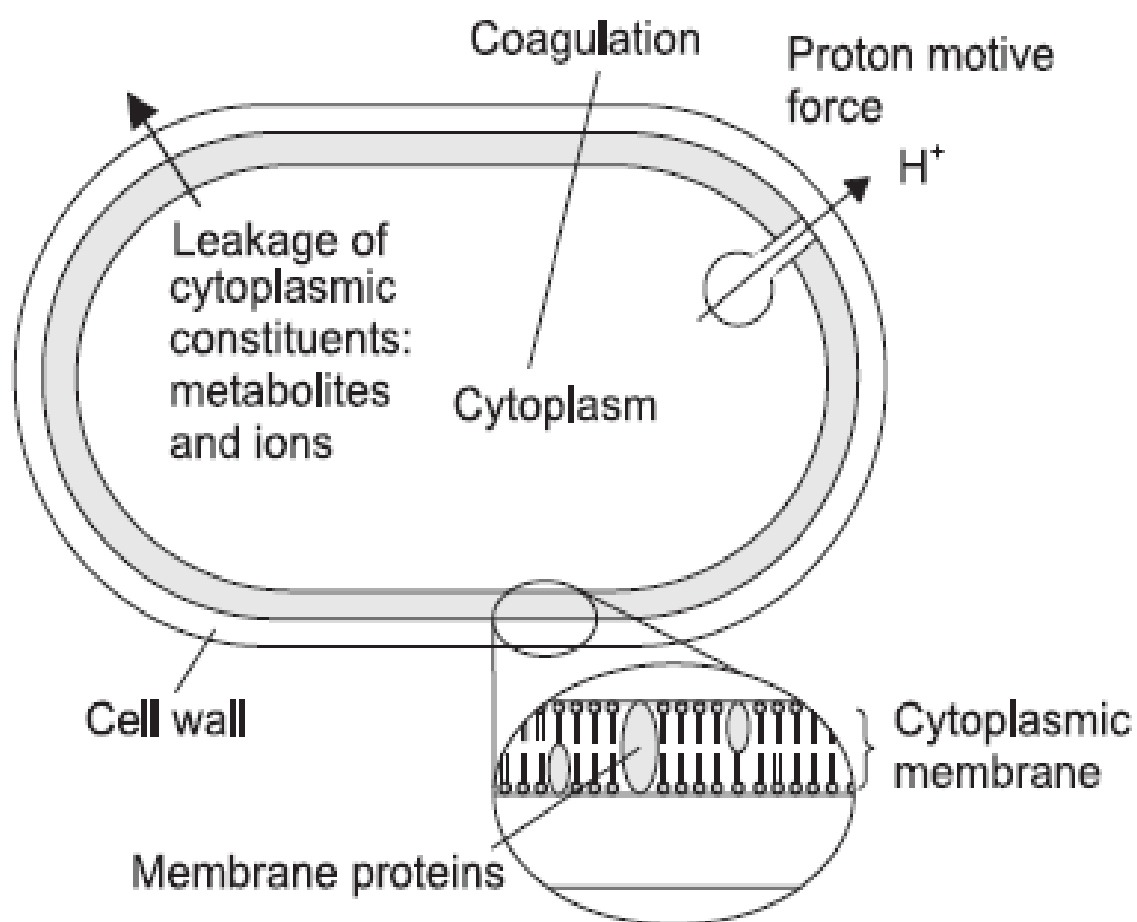


Figura 3. Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana (Fonte-BURT, 2004)

Estudos mostraram que os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais normalmente ocorrem por causar danos estruturais e funcionais sobre a membrana plasmática da bactéria, especialmente devido a hidrofobicidade dos compostos presentes (GONI et al., 2009), bem como a influência sobre sistemas enzimáticos e no material genético das bactérias (BURT et al., 2007; ARQUES et al., 2008).

Os estudos sobre ação antimicrobiana dos derivados vegetais e o sinergismo com drogas antimicrobianas convencionais tem sido freqüente (**BETONI et al., 2006**) apontando com isto que a interação sinérgica para as associações entre antibióticos com extratos de plantas medicinais sobre linhagens microbianas resistentes pode ser uma nova estratégia para tratamento de infecções, possibilitando o uso de drogas antimicrobianas quando esta isoladamente não se mostrou eficaz (KUMAN et al., 2009). Estudos de combinação com produtos naturais de plantas e drogas sintéticas são limitadas a poucos relatos, porém os resultados apresentados são muitas vezes positivos.

A 7 naphthoquinone-methyljuglone, isoladas de raiz de *Euclea natalensis*, uma planta africana, em combinação com isoniazida e rifampicina resultou em uma redução de quatro a seis vezes a concentração inibitória mínima (CIM) para estas drogas sobre *Micobacterium* sp. (BAPELA, 2006). **Betoni et al. (2006)** reportaram a ocorrência de sinergismo entre 8 extratos de plantas e 13 drogas antimicrobianas, sendo verificado sinergismo para 2 drogas com extrato de gengibre e com 11 drogas para capim limão e cravo da Índia quando as linhagens bacterianas testadas foram de *S. aureus* isoladas de casos clínicos humanos. Por outro lado, **Ushimaru (2007)** não observou o mesmo perfil de sinergismo quando este mesmo tipo de estudo foi realizado com linhagens de *E.coli*, tendo inclusive observado casos de antagonismo entre os produtos naturais testados e drogas antimicrobianas.

O extrato aquoso de sementes de *Cuminum cyminum* (cominho) possibilitou um aumento de 35% dos níveis de rifampicina no plasma de ratos, tendo esta atividade sido atribuída a presença de um glicosídeo flavonóide no extrato da planta testada (SACHIN et al., 2007).

Estudo desta natureza também foi realizado por Gallucci et al. (2006), que testaram terpenos comuns em óleos essenciais como carvona, carvacrol, timol,

eugenol e mirceno em cultivo juntamente com penicilina sobre uma linhagem padrão ATCC de *S. aureus* metilina resistente (MRSA) e outra de *E. coli*. Para a linhagem de MRSA verificaram sinergismo apenas com a utilização da carvona e antagonismo com o timol. Em relação a *E. coli* mencionam sinergismo com eugenol e timol, porém antagonismo com mirceno. Concluíram os autores que este tipo de combinação entre terpenos e antibióticos apresenta um aspecto promissor para uso no tratamento destas doenças.

Van Vuuren et al. (2009) reportaram existência de sinergismo nas diferentes concentrações de óleos comerciais de *Melaleuca alternifolia* (tea tree), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Mentha piperita* (hortelã pimenta) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) juntamente com ciprofloxacina sobre linhagens de *S. aureus* e *K. pneumoniae*; e com anfotericina B sobre linhagens de *Candida albicans*. Relataram também um perfil predominantemente antagônico para *R. officinalis* com as drogas testadas sobre *S. aureus* e *C. albicans* e sinergismo sobre *K. pneumoniae*. Quanto a *M. alternifolia* verificaram frequência maior para antagonismo quando comparado aos eventos de sinergismo. O *T. vulgaris* apresentou antagonismo sobre todos os micro-organismos testados enquanto a *M. piperita* mostrou sinergismo nos ensaios com *S. aureus*; antagonismo sobre *C. albicans* enquanto para *K. pneumoniae*, os resultados revelaram antagonismo ou sinergismo, porém dependente da concentração utilizada.

Sinergismo entre produtos naturais e drogas antimicrobianas tem sido assunto amplamente relacionado na linha de pesquisa sobre produtos naturais e, segundo alguns resultados, já foram esclarecidos mecanismos importantes para explicar o uso potencial dos antimicrobianos vegetais em associação com algumas drogas de uso na terapêutica de doenças infecciosas. Dentre os relatos feitos destacamos a revisão publicada por HEMAISWARYA et al. (2008) que reporta alguns mecanismos responsáveis pela interação de composto ativos de plantas e drogas antimicrobianas (Figura 4). Tais mecanismos descritos podem elucidar a potencialização da ação de drogas antimicrobianas quando utilizadas juntamente com alguns dos antimicrobianos de origem vegetal.

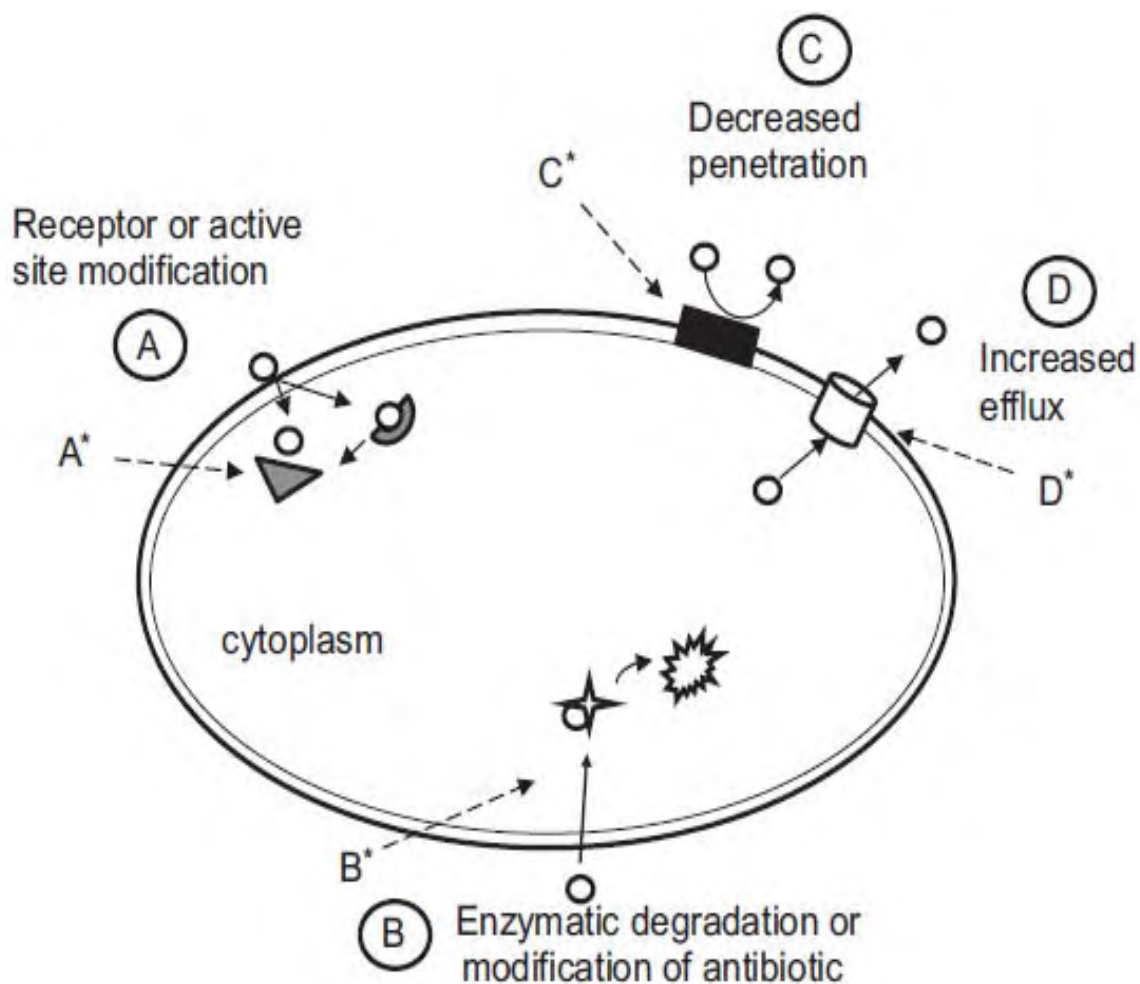


Figura 4. Metabólitos secundários de plantas com capacidade de influenciar nos mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos. (A*) Corilagina, tellimagrandina I, diterpeno 416 e composto P inibem PBP2a; (B*) EGCg (Epigalocatequina) inibe a β -lactamase; (C*) timol, carvacrol, ácido gálico reduzem a permeabilidade da membrana externa, e (D*) EGCg, 5'-methoxyhydnocarpina, reserpina, ácido carnósico e derivados isopimarano inibem a bombas de efluxo (Fonte-Adaptado de HEMAISWARYA et al., 2008).

Feitos os comentários acima, gostaria de relacionar os vários estudos realizados sob nossa coordenação e que tiveram por objetivo verificar ação de extratos de plantas de uso na medicina popular. Destacamos inicialmente aquele que consideramos o primeiro, uma monografia realizada no ano de 1996 (**RODOLFO, 1996**), quando, além de extrato alcoólico de própolis de *Apis mellifera*, foram testados os extratos de capim limão (*Cymbopogon citratus*), carqueja (*Bacharis trimera*), alho (*Allium sativum*), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) e guaco (*Mikania glomerata*). Neste estudo foi utilizada a metodologia da diluição em agar para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, isoladas de materiais biológicos humanos. Neste estudo verificamos ação inibidora considerável do cravo da Índia sobre *S. aureus*, com um valor de CIM_{90%} de 1,25 mg/mL, enquanto para *E. coli*, este valor foi de 2,95 mg/mL. Uma eficiência inibidora também foi observado para o extrato do alho sobre *E. coli* e *S. aureus* com valor de CIM_{90%} de 1,75mg/mL. Por outro lado, o extrato de capim limão apresentou valores de CIM_{90%} maior que 22,46 mg/mL para ambas espécies bacterianas estudadas. Vale destacar que nesta pesquisa foram realizados ensaios de determinação de curvas de sobrevivência para própolis e extratos mais eficientes (alho e cravo da Índia), sendo caracterizado o efeito bactericida sobre *E.coli* e bacteriostático sobre *S. aureus* considerando os três antimicrobianos naturais testados.

Embora ainda de forma não continuada para as pesquisas com plantas medicinais, realizamos um estudo (**STEFANINI et al., 2003**) que considero o pioneiro sobre utilização dos óleos essenciais e que retomamos de forma mais abrangente a partir do ano de 2006. Neste estudo utilizamos os óleos essenciais de funcho (*Foeniculum vulgare*), endro (*Anethum graveolens*), cominho (*Cuminum cyminum*) e coentro (*Coriandrum sativum*) sobre linhagens de *S. aureus*, *Enterococcus sp*, *P.aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella sp* utilizando a metodologia da difusão a partir de discos impregnados com os respectivos óleos essenciais. Verificamos que o óleo essencial de endro apresentou ação inibidora sobre *S. aureus*, *Salmonella sp* e *E. coli*. O cominho mostrou uma ação maior sobre as três bactérias Gram negativas enquanto o óleo de coentro foi efetivo apenas para a linhagem de *Salmonella* e funcho sobre *E. coli*. Assim concluímos que o efeito inibidor dos óleos essenciais varia de acordo com a espécie de planta produtora do óleo e o tipo de bactéria em estudo. Isto novamente vem confirmar a enorme

diversidade de resultados obtidos nos ensaios com produtos antimicrobianos naturais.

No ano de 2006 publicamos um estudo (**BETONI et al., 2006**) cujo objetivo, além de testar a ação inibidora de alguns extratos de plantas (Guaco (*Mikania glomerata*), goiabeira (*Psidium guajava*), cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), alho (*Allium sativum*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), gengibre (*Zingiber officinale*), carqueja (*Baccharis trimera*) e hortelã pimenta (*Mentha piperita*) sobre linhagens de *S. aureus*, foi verificar a ocorrência de sinergismo entre os extratos destas plantas e 13 drogas antimicrobianas de uso na terapêutica de doenças infecciosas: penicilina 10 UI (PEN), oxacilina 1 µg (OXA), vancomicina 30 µg (VAN), ampicilina 10 µg (AMP), cefalotina 30 µg (CFL), cefoxitina 30 µg (CFO); cloranfenicol 30 µg (CLO), gentamicina 10 µg (GEN), netilmicina 30 µg (NET), tetraciclina 30 µg (TET), eritromicina 15 µg (ERI); cotrimoxazol 25 µg (SUT) e ofloxacina 5 µg (OFX)). A metodologia adotada nos ensaios de sinergismo foi a da difusão a partir de discos impregnados com as respectivas drogas conforme a metodologia que foi utilizada previamente em **Fernandes Júnior et al. (2005)**.

Em relação à ação antimicrobiana dos extratos acima, verificamos que os com potencial antibacteriano elevados foram os preparados com cravo da Índia e folha de goiabeira, tendo apresentados CIM_{90%} de 0,36 e 0,52 mg/mL respectivamente. O extrato com a menor eficiência foi novamente o capim limão com valor de CIM_{90%} igual a 17,84 mg/mL. Um resultado interessante foi verificado no estudo para o extrato de capim limão, que embora tenha apresentado a menor eficiência anti-*S. aureus* (CIM_{90%}=17,84 mg/mL), apresentou sinergismo com 11 das 13 drogas estudadas, resultados este igual ao obtido com o extrato de cravo da Índia, considerado o mais eficiente entre os extratos estudados (CIM_{90%}=0,36mg/mL).

Assim sendo, concluímos que sinergismo entre produtos naturais e drogas antimicrobianas, pode ocorrer mesmo para extratos que não apresentam uma ação antimicrobiana tão significativa. Outra observação importante foi que houve uma ocorrência aparentemente maior de sinergismo entre os extratos com as drogas que apresentam como mecanismo de ação a inibição da síntese protéica na bactéria. Este aspecto merece então maiores esclarecimentos em estudos futuros para tentar elucidar tal preferência quanto a este modo de ação.

Após este estudo, surgiu uma questão a ser respondida. Tal sinergismo foi verificado para estes extratos e *S. aureus*, mas tais interações, ou efeitos inibitórios, apresentariam o mesmo tipo de comportamento para outras espécies bacterianas? Assim, iniciamos um estudo no mesmo ano de 2006 com seis dos extratos testados por **Betoni et al. (2006)**, porém com o objetivo de demonstrar a ação sobre outras bactérias (**USHIMARU et al., 2007**), sendo estas, além de *S. aureus*, o *Enterococcus* sp, a *E. coli* e a *Salmonella* Typhimurium. Os resultados foram variados, porém novamente o cravo da Índia foi o mais eficiente, tendo o *Enterococcus* sp apresentado uma sensibilidade ligeiramente menor que o *S. aureus*, enquanto *Salmonella* e *E.coli* não deferiram quanto as respectivas sensibilidades aos antimicrobianos testados. Os aspectos sobre o sinergismo entre estes extratos e drogas antimicrobianas foram reportados recentemente em **Ushimaru et al. (2012) (disponível on line)**, embora os experimentos tenham sido executados no ano de 2006. Neste estudo foi reportado sinergismo entre os extratos testados em **Ushimaru et al. (2007)** e drogas sobre linhagens de *E. coli* apenas, pois nos estudos anteriores foram realizados ensaios apenas com linhagens de *S. aureus*. Neste caso, verificamos que o sinergismo entre produtos naturais e drogas varia conforme a bactéria estudada, pois no caso da *E. coli*, ocorreu sinergismo apenas entre capim limão e a polimixina e entre alho e a gentamicina. Outro aspecto importante deste estudo é que diferente do que observado para *S. aureus*, ocorreram vários casos de antagonismo entre os extratos e as drogas estudadas (Tabela 1).

Na tentativa de diversificar os resultados obtidos com outras espécies de plantas com ação antimicrobiana, em **Silva (2010)**, cujo estudo encontra-se em fase de envio a publicação, objetivamos verificar o efeito antimicrobiano de plantas consideradas do cerrado, sendo as amostras obtidas na região de Botucatu/SP. As plantas estudadas foram: *Achyrocline satureioides* (Lam) DC (macela), *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville (barbatimão), *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC (quaresma-branca), *Davilla elliptica* A. St-Hil (lixinha), *Siparuna guianensis* (negramina) e *Solanum lycocarpum* A.St-Hil (lobeira), e através da metodologia da diluição em agar, foram testadas quanto ao efeito inibidor, sobre *S. aureus* (n=10), *E. coli* (n=11) e *P.aeruginosa* (n=11), isoladas de

Tabela 1. Interações entre extratos de plantas medicinais e drogas antimicrobianas para linhagens de *E. coli* isoladas de casos clínicos humanos.

Table 2. Interactions between plant extracts and antimicrobial drugs verified using 14 *E. coli* strains isolated from human specimens.

Antimicrobial drugs	<i>P. guajava</i>	<i>C. aromaticus</i>	<i>Z. officinale</i>	<i>M. glomerata</i>	<i>C. citratus</i>	<i>A. sativum</i>
Ampicillin	I	I	I	I	I	I
Amoxicillin and clavulanic acid	I	I	I	I	A	I
Cephalothin	I	I	I	A	A	I
Cefoxitin	I	A	I	A	I	I
Ciprofloxacin	A	A	I	A	A	I
Gentamicin	A	A	A	A	A	S
Polymyxin	A	I	A	I	S	I
Sulphamethoxazole and trimethoprim	A	I	I	A	A	I
Tetracycline	I	I	I	A	I	I

Note: S, synergism; A, antagonism; and I, indifference (synergism or antagonism when $p \leq 0.05$).

Fonte - Ushimaru et al. (2012) (Disponível on line)

casos clínicos humanos. As plantas foram coletadas em áreas próximas a sede do município de Botucatu/SP e os extratos preparados com metanol 70% e material vegetal desidratado (50°C) e moídos em moinho de facas. A extração foi feita durante 48 horas em temperatura de geladeira, seguido de filtração e eliminação do solvente metanol em evaporador rotativo e determinação do peso seco dos extratos (mg/mL) e análise fitoquímica dos mesmos. Os ensaios de sensibilidade para as linhagens bacterianas foram realizados utilizando a metodologia da diluição dos extratos em Mueller Hinton Agar (MHA) e determinação da CIM em mg/mL. Verificou-se em função das bactérias testadas, e em ordem decrescente de atividade antibacteriana, que para *S. aureus*: os mais eficientes extratos foram: Lixinha(folha)>Barbatimão(folha)>Quaresma-branca>Macela>Lixinha(fruto)>Barbatimão (casca)>Lobeira >Negramina. Para para *E. coli*: Lixinha(folha)>Barbatimão (folha) > Lixinha(fruto)= Barbatimão (casca)> Quaresma-branca> Macela=Lobeira>Negramina. Quanto a *P. aeruginosa*: Lixinha (folha)>Barbatimão (casca)>Barbatimão(folha)>Lixinha(fruto)> Macela > Lobeira >Quaresma-branca=Negramina.

A análise fitoquímica dos extratos do estudo de **Silva (2010)** revelou a presença dos seguintes compostos: **a)** compostos fenólicos no barbatimão (folha), lixinha (fruto), macela, lobeira e negramina; **b)** flavonóides em todas as plantas

estudadas; **c)** saponinas em barbatimão (casca e folha), lixinha (fruto e folha) e quaresma-branca; **d)** triterpenos e esteróides livres em barbatimão (folha), lixinha (folha), macela, quaresma-branca, lobeira e negramina; **e)** taninos em barbatimão (casca e folha), lixinha (frutos e folhas) e na quaresma-branca; **f)** quinonas em barbatimão (folha), lixinha (folha); **g)** cumarinas em barbatimão (folha), quaresma-branca e negramina; **h)** alcalóides apenas no extrato de negramina. De forma geral, verificou-se uma maior sensibilidade da bactéria *S. aureus* frente aos derivados vegetais testados, com destaque para o extrato preparado com folhas de lixinha.

Com finalidade de ilustrar este texto, na Figura 5 são apresentadas fotos que mostram o preparo dos extratos das plantas estudadas até o presente momento.

Até este momento, mesmo aqueles estudos que tinham por objetivo verificar sinergismo, foram realizados utilizando-se de extratos obtidos com as plantas medicinais. Assim, optamos também em realizar estudos com óleos essenciais, sendo que o realizado por **Silva et al. (2009)** foi aquele que colocou estes importantes derivados vegetais de forma definitiva em nossa linha de pesquisa. Este tipo de antimicrobiano vegetal também possibilitou diversificar os seus usos em nossos estudos, especialmente como agentes antimicrobianos em alimentos e, como já esta sendo feito em projeto de pesquisa de doutorado, verificação dos seus efeitos *in vivo*.

Assim, no trabalho realizado por **Silva et al. (2009)** objetivamos comparar a ação antibacteriana de óleos essenciais obtidos de *Rosmarinus officinale* (alecrim), *C. aromaticus* (cravo da Índia), *Z. officinalis* (gengibre), *C. citratus* (capim limão), *M. piperita* (hortelã pimenta) e *Cinnamomum zeilanicum* (canela) sobre linhagens de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de casos clínicos humanos utilizando a metodologia da diluição em agar Mueller Hinton (MHA) para determinação da CIM. Além destes óleos essenciais também foi testada a ação antibacteriana de uma amostra de óleo vegetal de sementes de *Vitis vinifera* (Uva). Foi verificado que o óleo mais eficiente foi o de canela, com CIM_{90%} de 0,047 e 0,09%v/v sobre *S. aureus* e *E. coli* respectivamente. O óleo de alecrim foi o menos eficiente sobre ambas as bactérias estudadas (CIM_{90%} acima de 3,0 e 0,55 % v/v sobre *E. coli* e *S. aureus* respectivamente).



Figura 5. Elaboração dos extratos hidro-alcólicos de plantas (A) *Davilla elíptica*, (B e C) obtenção do filtrado contendo solvente metanol, (C) Evaporador rotativo do Departamento de Microbiologia e Imunologia /IBB/UNESP/Botucatu utilizado na remoção do solvente e obtenção do extrato (Fonte: ARY FERNANDES JÚNIOR)

Ficou estabelecido também que os valores de CIM_{90%} foram bactericidas ou bacteriostáticos em função do óleo essencial e bactéria testada e como conclusão novamente foi percebida a maior sensibilidade da bactéria Gram positiva que a Gram negativa.

Na Figura 6 é mostrado o destilador que utilizamos no preparo dos vários óleos essenciais já testados. A aquisição deste equipamento representou um diferencial importante das nossas pesquisas uma vez que os óleos essenciais testados foram na sua maioria preparados em nossos laboratórios mesmo, ou seja, no departamento de Microbiologia e Imunologia/IBB. Além disto, pudemos também testar óleos essenciais de plantas cujos óleos não são produzidos com finalidade comercial como por exemplo o de *Vernonia polyanthes* (assa-peixe) e *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), conforme fotos apresentadas na Figura 6, *Laurus nobilis* (louro) além de outros.

Considerando os valores já estabelecidos de CIM_{90%} para alguns óleos essenciais em nosso laboratório, em estudo realizado por **Zago et al. (2009)** reportamos a ocorrência de sinergismo entre óleos essenciais (*Rosmarinus officinalis* - alecrim, *C. aromaticus*-cravo da índia, *Z. officinalis*-gengibre, *C. citratus*-capim limão, *M. piperita*-hortelã pimenta e *Cinnamomum zeilanicum*-canela) e drogas antimicrobianas (cloranfenicol (30µg), gentamicina (10µ), cefepima (10µg), tetraciclina (30µg), sulfazotrim (25µg), cefalotina (30µg), ciprofloxacina (5µg) e rifampicina (5µg)) utilizando cepas de *S. aureus* e *E. coli*.

Inicialmente foram realizados ensaios para obtenção dos valores de CIM_{90%}, objetivando confirmar os valores obtidos em estudo realizado por **Silva et al. (2009)**, os quais foram bastante aproximados por tratar-se das mesmas linhagens e também as mesmas amostras dos óleos essenciais. O aspecto importante deste estudo foi ter acrescentado cepas de *E. coli* objetivando também verificar a ocorrência ou não de sinergismo para este tipo bacteriano em particular. A metodologia para o estudo de sinergismo foi novamente a dos discos e realização de dois tipos de antibiogramas em placas contendo MHA, ou seja, um controle, conforme preconizado por Kirby & Bauer, e outro tratamento, no qual foram adicionados volumes para cada um dos óleos, sendo estes calculados para obter nestas placas valores equivalente a ¼ dos valores de CIM_{90%} obtidos previamente.



Figura 6. Preparo de óleo essencial de plantas (A) *Vernonia polyanthes*, (B) *Baccharis dracunculifolia*, (C) Aparelho de destilação dos óleos essenciais por arraste de vapor tipo Clevenger da marca Marconi, modelo MA480, do Departamento de Microbiologia e Imunologia/IBB/UNESP/Botucatu, (D) Detalhe do óleo essencial no frasco tipo Fiorentino. (Fonte – ARY FERNANDES JÚNIOR)

Verificamos em **Zago et al. (2009)** que a frequência de sinergismo foi maior para a bactéria *S. aureus*, sendo que para um total de oito drogas testadas, o óleo de capim limão apresentou sinergismo com todas as drogas, enquanto o óleo de hortelã pimenta apresentou sinergismo com sete drogas. O óleo de canela, embora tenha apresentado um dos menores valores de CIM para as duas espécies bacterianas, não apresentou sinergismo com as drogas testadas para as duas espécies bacterianas. Vale destacar também que não houve qualquer indício de antagonismo entre os antimicrobianos testados.

Recentemente, e considerando agora as possíveis interações entre antimicrobianos distintos, realizamos estudo (**PROBST et al., 2011**) cujo objetivo foi verificar a possibilidade de um produto natural potencializar o efeito de outro produto natural. Neste caso em particular, verificamos as possíveis interações extrato etanólico de própolis (EEP) de *A. mellifera*, obtida na região de Botucatu/SP, e óleos essenciais de plantas (canela, gengibre, cravo da Índia e hortelã pimenta). Previamente foram determinados os valores de CIM_{90%} para 16 linhagens de *S. aureus* e 16 de *E. coli*, todas isoladas de materiais biológicos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. Os resultados deste estudo encontram-se discutidos na primeira parte deste material, quando foram feitos comentários sobre os estudos com própolis.

Gostaria de informar que todos os estudos publicados até então foram de orientações de Iniciação Científica. A partir do nosso credenciamento junto ao programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada do IBB/UNESP, ocorrido no ano de 2008, foram finalizados cinco projetos, sendo quatro orientações de mestrado e uma de doutorado, embora no presente momento estejamos orientando outros dois doutorados e um mestrado.

Assim, como publicações efetuadas nas orientações de pós-graduação, destacamos a de **Silva et al. (2010)**. Esta publicação é o resultado de uma revisão bibliográfica sobre os aspectos relacionados aos mecanismos de ação dos produtos naturais, bem como estudos que reportam sinergismo entre produtos naturais e drogas antimicrobianas. Assim, apresentamos neste trabalho informações mais recentes sobre testes *in vitro* de ação antimicrobiana de uma variedade de plantas medicinais. Como resultados importantes deste projeto de mestrado, foram então nossas observações em **Silva (2010)** e **Silva et al. (2012) (disponível on line)**, cujo objetivo foi comparar a ação antibacteriana de extratos e

óleos essenciais obtidos de *Eugenia uniflora* L (pitanga), *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim do campo), *Matricaria chamomilla* L (camomila) e *Vernonia polyanthes*-Less (assa peixe). Neste estudo foram feitas as determinações fitoquímicas para os extratos bem como análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) dos óleos essenciais. Novamente foram comparadas as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, sendo que o *S. aureus* foi novamente mais susceptível que a *E. coli* frente a todos os derivados vegetais, bem como os compostos fenólicos foram os antimicrobianos vegetais mais freqüentes nos produtos naturais. Ainda em via de publicação, destacamos os resultados apresentados na dissertação **(SILVA, 2010)** onde os mesmos produtos naturais acima citados foram testados quanto ao sinergismo com drogas convencionais utilizando tanto a metodologia dos discos para as drogas cloranfenicol (30µg), gentamicina (10µg), cefepime (30µg), tetraciclina (30µg), sulfazotrin (25µg), cefalotina (30µg), ciprofloxacina (5µg), rifampicina (5µg), como também a metodologia da curva de sobrevivência.

Resultados importantes foram obtidos para os óleos de alecrim do campo e assa peixe, que apresentaram sinergismo com todas as drogas testadas, enquanto para os respectivos extratos não houve qualquer indicio de sinergismo com as mesmas drogas testadas. Outro aspecto, também já verificado em estudos anteriores, foi que para o *S. aureus* houve casos de sinergismo ou ausência de interação enquanto que para as linhagens de *E. coli*, a freqüência de sinergismo foi significativamente menor, inclusive com alguns casos de antagonismo, como por exemplo entre extrato de camomila e cefalotina, gentamicina, cefepime e cloranfenicol. Assim, podemos concluir novamente que o sinergismo depende da bactéria testada bem como o tipo de preparo do derivado vegetal para uma mesma espécie de planta também pode influenciar nos resultados.

O uso dos óleos essenciais, tanto visando a terapêutica de doenças infecciosas como aspectos de aromaterapia, também foi verificado em **Machado (2011)**, uma das orientações de mestrado defendidas de 2011, estando os manuscritos em processo de avaliação para publicação, bem como tendo já ocorrida uma publicação **(MACHADO & FERNANDES JÚNIOR, 2011)**, sendo esta de caráter mais geral do uso dos óleos essenciais em procedimentos relacionados a aromaterapia. Assim, em **Machado (2011)**, procuramos apresentar um aspecto mais aplicado para os óleos essenciais, pois procuramos enfatizar o efeito

antimicrobiano de óleos essenciais de uso nas terapias naturais, especialmente na aromaterapia.

O aspecto diferencial do estudo é que utilizamos apenas óleos essenciais obtidos diretamente de uma empresa do setor de produtos naturais e aromaterapia (By Samia Aromaterapia-São Paulo-Brasil). Verificamos o efeito antimicrobiano *in vitro*, seja no meio de cultura para linhagens de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, bem como na água, simulando banho de imersão. Foram testados 27 óleos essenciais quanto a ação antibacteriana *in vitro* e escolhidos cinco óleos destes para as fases seguintes deste estudo, ou seja, para testar ação antimicrobiana na água e também na pele de humanos voluntários.

Os resultados deste estudo, de acordo com o número de óleos testados e bactérias, foram diversificados, embora o *S. aureus* tenha se mostrado novamente mais susceptível que as outras duas bactérias Gram negativas testadas. Os valores de CIM_{90%} foram de 0,21mg/mL para os óleos de pimenta negra (*Piper nigrum*) e tea tree (*Melaleuca alternifolia*) e 26,52mg/mL para o óleo de copaíba (*Copaíba officinalis*). Para *E. coli*, o óleo de canela (*Cinnamomum cassia*) foi o mais efetivo (2,0 mg/mL) enquanto para *P. aeruginosa* o cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) foi mais efetivo (8,29 mg/mL). Utilizando valores de CIM obtidos *in vitro* foram selecionados cinco óleos (cravo da Índia-*Syzygium aromaticum*, gerânio-*Pelargonium graveolens*, lavanda-*Lavandula angustifolia*, palmarosa-*Cymbopogon martini* e tea tree-*Melaleuca alternifolia*) e novamente foram realizados ensaios para verificação da ação antibacteriana através da diluição individual de cada óleo em água e salina visando redução na contagem bacteriana (*E.coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*) em função do tempo. Tanto nos ensaios com água ou salina, os perfis de sensibilidade das linhagens bacterianas aos óleos essenciais foram próximos entre si, porém significativamente distintos quando comparados aos ensaios controles, pois apresentaram uma capacidade inibidora estatisticamente significativa. Na Figura 7 ilustramos resultados de curvas de sobrevivência quando óleos essenciais foram adicionados individualmente em água para simular efeito antimicrobiano em um banho de imersão frente as três bactérias estudadas.

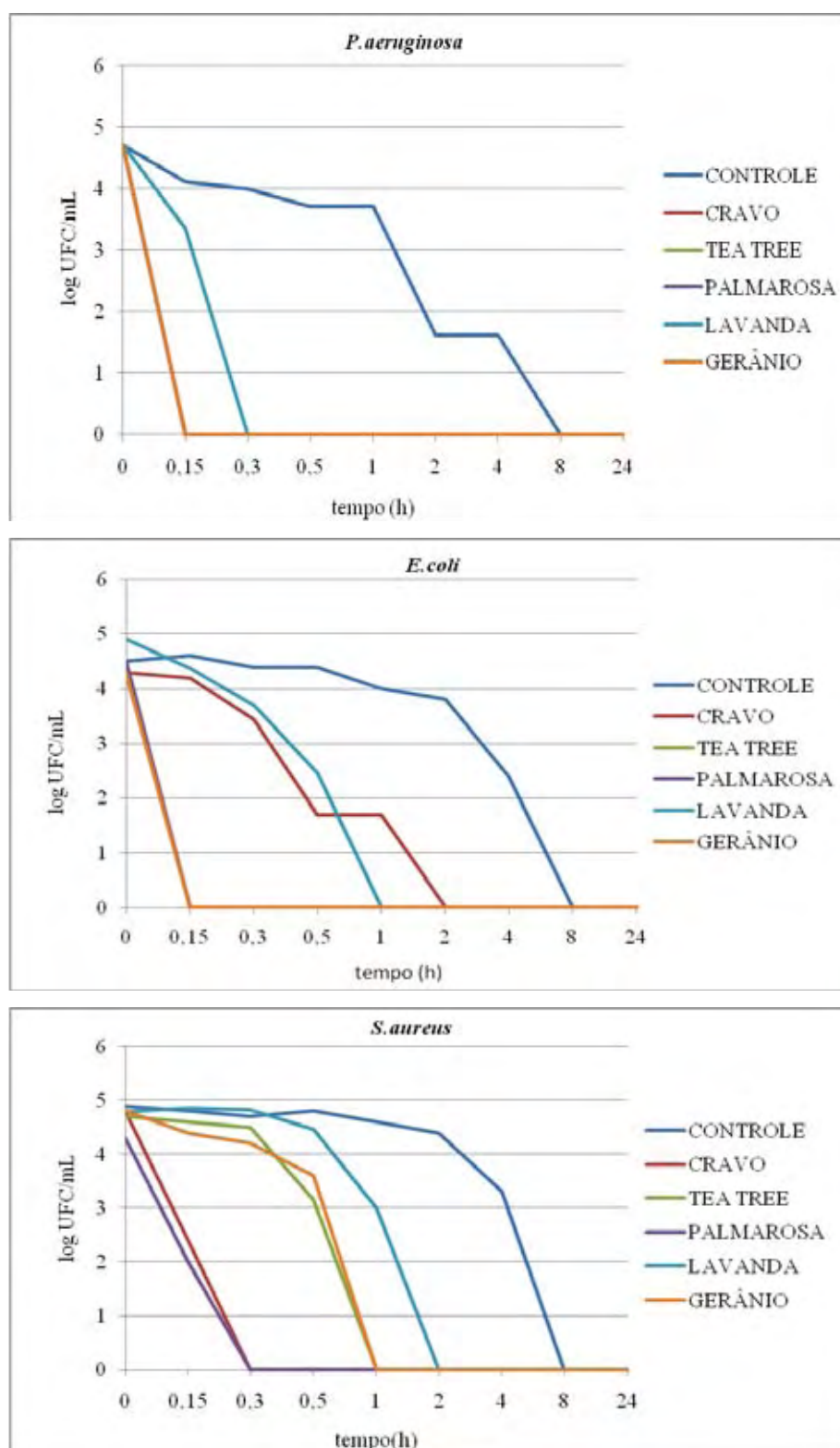


Figura 7. Ilustração de um ensaio de curva de sobrevivência para uma cepa padrão ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* em água adicionada individualmente com cinco óleos essenciais diferentes (Fonte-MACHADO (2011)).

Outro aspecto interessante do estudo de **Machado (2011)** foi à determinação da influência dos óleos essenciais sobre a microbiota da pele humana. Para isto foi aplicada sobre a pele de voluntários os respectivos preparados a base de 0,5% de óleos essenciais diluído em óleo vegetal de semente de uva, sendo em seguida feitas coletas de amostra de microbiota da pele utilizando placas de contato tipo Rodac contendo PCA (Plate Count Agar), MacConkey e Manitol. Após incubação (37°C/24-48 horas) foram feitas leituras do crescimento bacteriano e foi observado que os preparados não reduziram as contagens bacterianas da microbiota da pele humana quando comparados com os respectivos controles. Assim, concluímos neste estudo que, nas condições que os ensaios foram realizados, o uso destes antimicrobianos quando diluídos em veículo apropriado não interfere de forma significativa sobre as bactérias da pele humana, reforçando assim o uso nos procedimentos de aromaterapia.

Motivado pelo estudo de **Probst et al. (2011)**, quando verificamos as interações entre produtos naturais (própolis e óleos essenciais), finalizamos recentemente (fevereiro pp.) uma orientação de mestrado (**PROBST, 2012**), cujos resultados mostraram que a mistura de óleos essenciais, em determinadas proporções, podem ter seus efeitos antimicrobianos potencializados. Neste caso verificamos que o óleo essencial de alecrim (*R. officinalis*) misturado com o óleo de alecrim do campo (*B. dracunculifolia*) foram os mais eficientes sobre linhagens de *S. aureus* quando utilizado a metodologia da diluição em discos, enquanto a mistura entre cravo da Índia (*C. aromaticus*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre as linhagens de *S. aureus* e *E. coli*. Sobre *P. aeruginosa*, a melhor combinação foi entre *B. dracunculifolia* e *C. aromaticus*. Neste estudo preocupou-se também na caracterização química dos óleos essenciais e misturas, utilizando CG-EM. Apenas a título de ilustração, na Figura 8, apresentamos cromatograma de uma das misturas testadas entre *C. aromaticus* e *C. zeylanicum*.

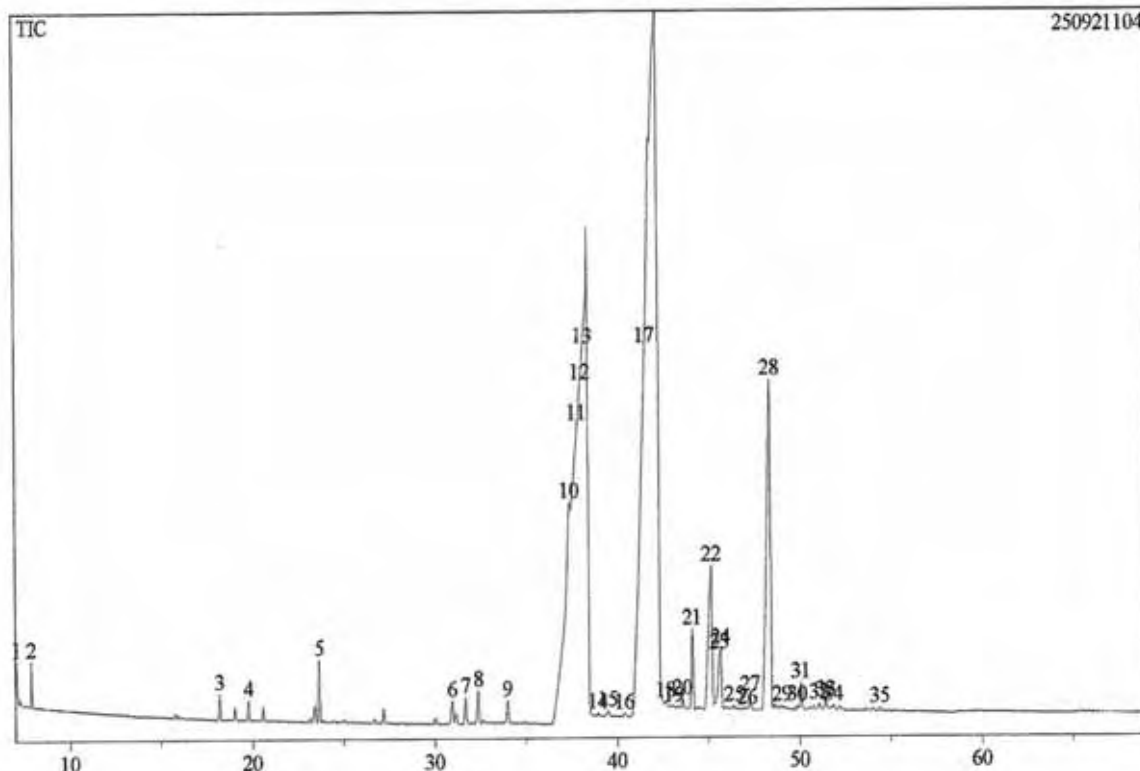


Figura 8. Cromatograma da combinação entre os óleos essenciais de *C. aromaticus* e *C. zeylanicum* obtido por análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Os números referem-se aos picos respectivos e identificação do composto mais o seu percentual. 3- α -pineno (0,16), 5- eucaliptol (0,49), 11, 12, 13- cinamaldeído (38,22), 17- eugenol (39,44), 21- β -cariofileno (1,30), 22- acetato de cinamila (3,96), 28- acetato de eugenila (7,80). (Fonte- PROBST, 2012)

Como resultado geral dos estudos realizados visando à terapêutica de doenças infecciosas, destacamos o grande potencial antimicrobiano dos derivados de plantas, porém outros estudos deverão ser conduzidos objetivando caracterizar os possíveis efeitos tóxicos destas substâncias bem como a caracterização fitoquímica destes produtos, pois considerando a pretensão de formular medicamentos, é sabido que os protocolos devem ser seguidos para mostrar a inocuidade do medicamento durante o seu uso pela população em geral.

5.3. Óleos essenciais como aditivo em alimentos

Os métodos de conservação de alimentos para o consumo humano têm basicamente dois propósitos: **a)** desacelerar os processos naturais de degradação inerentes a um alimento que levam à deterioração e **b)** controlar o crescimento de microorganismos deteriorantes ou patogênicos no alimento. Assim, as formas de controle de micro-organismos nos alimentos podem ser tanto para prevenir a contaminação inicial ou mesmo a remoção destes. Por outro lado, a inativação também é normalmente exigida e feita pelo uso de métodos tradicionais, tais como calor ou radiações (gama, feixe de elétrons, de raios-X, ultravioleta) ou por métodos mais recentes com o uso de pressão hidrostática elevada ou campo elétrico pulsado. Processos de inibição incluem refrigeração ou congelamento, secagem (redução da atividade de água do alimento), embalagem de atmosfera modificada, redução do pH (acidificação) ou utilização de conservantes químicos antimicrobianos (DAVIDSON, 2006).

Cita ainda o autor acima que os antimicrobianos utilizados em alimentos podem ser definidos como compostos químicos presentes naturalmente ou adicionados aos alimentos, impregnados em embalagens ou em superfícies de contato com alimentos ou ainda presentes nos ambientes de processamento de alimentos, mais que tem por objetivos inibir micro-organismos patogênicos ou deteriorantes. Estes compostos são também chamados de conservantes que atuam como antimicrobianos, antioxidantes ou mesmo anti-escurecimento (prevenção do escurecimento enzimático).

Por outro lado, cada vez mais os consumidores estão exigindo produtos mais naturais e/ou minimamente processados (MARINO et al., 2001). Assim, para satisfazer esses requisitos um dos grandes desafios das indústrias de alimentos consiste em reduzir aditivos químicos convencionais em formulação de alimentos. O uso alternativo de recursos naturais, especialmente os produtos vegetais, tem recebido mais e mais atenção, principalmente porque muitos desses produtos têm possibilitado outras propriedades funcionais aos alimentos (GONZALEZ et al., 2011).

Em geral são necessárias concentrações mais elevadas de óleos essenciais quando aplicados diretamente no alimento que aquela verificada nos ensaios *in vitro*, e conseqüentemente a aplicação prática dos óleos essenciais tem

tido restrições, uma vez que a adição de altas concentrações dos óleos provoca alterações indesejáveis no produto alimentar, especialmente no sabor (MISAGHI & BASTI, 2007, **BARBOSA et al., 2009**).

Além disto, para estabelecer a utilidade deste importante recurso natural como conservantes antimicrobianos, torna-se indispensável que estes sejam avaliados isoladamente e em combinação com outros fatores de conservação, para determinar se existem efeitos sinérgicos e assim poder conceber múltiplas barreiras (POL et al., 2002).

Conforme a economia global gera produção e transporte de alimentos em escala mundial, o uso de antimicrobianos em alimentos se faz cada vez mais necessário, para que se garanta fornecimento de alimentos de qualidade. Na indústria de alimentos, o uso de conservantes naturais tem se tornado freqüente; muitas especiarias e ervas representam alternativas em potencial no combate à deterioração e ao crescimento de micro-organismos patogênicos (TASSOU et al., 2000), desde que apresentem, obviamente, propriedades antimicrobianas (NYCHAS et al., 1990).

Como agentes ativos farmacologicamente, os óleos essenciais, conforme já reportado, apresentam grande espectro de atuação, contra vírus, fungos, parasitas e bactérias, o que também se observa na aplicação alimentícia. Segundo Lanciotti et al. (2004) o interesse na possibilidade de uso de compostos naturais na prevenção do desenvolvimento microbiano em alimentos tem notável crescimento como resposta à pressão do consumidor para reduzir ou até mesmo eliminar os aditivos sintéticos adicionados nos alimentos industrializados.

Antimicrobianos naturais ocorrem em animais e plantas como mecanismo evolutivo de defesa do hospedeiro contra invasores e estão presentes em abundância no meio ambiente. Tais compostos podem exibir atividade antibacteriana em alimentos, ocorrendo naturalmente, ou podem, ainda, ser utilizados como aditivos em outros alimentos. O potencial de aplicação desses compostos pela indústria alimentícia é significativo, e estudos para incorporação de antimicrobianos em alimentos, bem como para maximizar sua biofuncionalidade, ocorre no mundo todo (NAIDU, 2000). Trabalhos recentes atestam a viabilidade de utilização de antimicrobianos naturais em alimentos (HAO et al., 1998; FISHER & PHILLIPS, 2008; GOVARIS et al., 2010).

No mercado europeu estão disponíveis conservantes alimentícios compostos por 50% de óleos essenciais (alecrim, artimísia e citrus) e 50% de glicerol (MENDONZA-YEPES et al., 1997). Outros produtos são encontrados também nos Estados Unidos a base de óleos essenciais dispersos em soluções de citrato de sódio ou cloreto de sódio, reconhecidos como aditivos alimentícios seguros (CUTTER, 2000). Entretanto, quantidades insignificante desses conservantes alimentícios contendo óleos essenciais estão disponíveis no mercado quando comparada aos demais conservantes usuais. Burt (2004) destacou a necessidade do enfoque de pesquisas para os aspectos legais do uso dos óleos essenciais e seus componentes em alimentos, em função das suas ações genotóxicas que podem apresentar, além de estudos que demonstrem os mecanismos de ação dos óleos essenciais, possibilitando assim aplicações tecnológicas adequadas.

Assim, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem despertado interesse das pesquisas científicas na área de alimentos, especialmente sobre fungos patogênicos (BAKKALI et al., 2005; SACCHETTI et al., 2005; ANGIONI et al., 2006; CHENG et al., 2008) e bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos, como as *E.coli* O157:H7, *Shigella sonnei*, *S. flexner*, *Salmonella* Typhimurium e *P. aeruginosa* (BAGAMBOULA et al., 2004; MOREIRA et al., 2005). Bruni et al. (2004) e Oussalh et al. (2007) também reportaram a ação de óleos essenciais contra *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*.

As pesquisas citadas têm apresentado valores de CIM através dos métodos *in vitro* de difusão em disco e microdiluição. Entretanto, visando à aplicação em alimentos, estudos têm buscado a verificação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais quando aplicados em alimentos, como queijo (SMITH-PALMER et al., 2001), vegetais minimamente processados (LANCIOTTI et al., 2004; GUTIERREZ et al., 2009), brócolis (MUNHOZ et al., 2009), cevada (MOOSAVY et al., 2008), linguiça (BUSATTA et al., 2007; BUSATTA et al., 2008) e carne moída (**BARBOSA et al., 2009**) e hambúrguer (**BARBOSA et al., 2010**)

Por outro lado, a utilização de óleos essenciais de ervas e especiarias com finalidade antimicrobiana objetivando efeitos comparáveis aos aditivos sintéticos ainda enfrentam desafios consideráveis, e que segundo TAJKARIMI et al.(2010), três razões principais devem ser destacadas: **a)** informações ainda limitadas sobre os efeitos nos alimentos; **b)** apresentam forte odores e; **c)** elevados custos. Por

outro lado, se não visando a ação antimicrobiana, Smith-Palmer et al. (2001) descreveram propostas de incorporar os óleos essenciais em alimentos que já tenham um aroma forte, para assim mascarar a presença do mesmo; aplicar alguns dos principais componentes ativos, ao invés do óleo completo; desenvolver combinações sinérgicas, tanto entre dois óleos essenciais ou um óleo essencial com outro antimicrobiano; combinar os óleos essenciais com agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), que embora esse não seja considerado um conservante, ele pode potencializar outros agentes antimicrobianos. Também é sugerida utilização de óleos essenciais juntamente com agentes dispersantes, como o polietilenoglicol, para aumentar o contato deste com as células microbianas, especialmente em alimentos com um alto teor lipídico.

Assim, paralelamente aos estudos visando ação antimicrobiana e com potencial de uso na terapêutica de doenças infecciosas, iniciamos no ano de 2007 projeto de Iniciação Científica, inclusive já citado (**BARBOSA et al., 2009**), com finalidade de testar o efeito inibidor de óleos essenciais de plantas condimentares (*Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum majorana* (manjerona), *Origanum vulgare* (orégano), *Ocimum basilicum* (majoricão), *Z. officinale* (gengibre), *C. citratus* (capim limão) e *C.aromaticus* (cravo da Índia) sobre linhagens de *E.coli*, *S.aureus*, *L.monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis. Todos os óleos mencionados foram produzidos em nosso laboratório utilizando o destilador de óleos mencionado anteriormente (Figura 6).

Iniciamos os ensaios *in vitro* para determinação da CIM_{90%} para as linhagens bacterianas, seguido de mistura das bactérias em amostras de carne bovina moída seguido da adição dos óleos essenciais e verificação da redução na contagem após um tempo pré estabelecido (três horas). Verificamos novamente uma maior sensibilidade das linhagens Gram positivas aos óleos essenciais durante os ensaios *in vitro* sendo que o cravo da Índia foi o mais eficiente, com valor de CIM_{90%} de 0,09%v/v, quando considerado o total de linhagens, independente se Gram positiva ou Gram negativa. Porém, quando considerado por grupo de bactérias, o capim limão foi o mais eficiente sobre Gram positivas, com uma CIM_{90%} de 0,05%v/v e o cravo da Índia o mais efetivo sobre as linhagens Gram negativas (0,10 %v/v). Este estudo mostrou resultados importantes uma vez que quando as concentrações determinadas *in vitro* foram utilizadas diretamente no alimento, a redução, após três horas de contato bactéria e óleos, não foi

significativa. Isto possibilitou a conclusão de que o efeito inibidor dos óleos essenciais, quando adicionado diretamente ao alimento, é reduzido e nos mostrou que há necessidade de concentrações mais elevadas quando diretamente no alimento. Neste estudo verificou-se também o efeito da adição dos óleos essenciais sobre a microbiota normal da carne moída, ou seja, sobre as populações mesofílica facultativa e psicrotrófica presentes, após período de 6 e 24 horas de contato. Novamente não foi verificada uma redução significativa na contagem destes micro-organismos, embora uma ligeira inibição tenha ocorrido sobre a população de bactérias psicrotóficas.

Dando continuidade com esta ênfase para óleos essenciais, realizamos um projeto de mestrado (**BARBOSA, 2010**), cujo objetivo foi verificar ação antimicrobiana de óleos, utilizando modelos cárneos (carne moída bovina e hambúrguer).

A referida dissertação foi dividida em três partes, tendo a primeira parte como objetivo verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OE) de orégano (*O. vulgare*), tomilho (*T. vulgaris*), manjericão (*O. basilicum*) e manjerona (*O. majorana*) em amostras de carne moída e hambúrguer bovino, previamente irradiada para eliminação da microbiota natural da carne, contaminadas artificialmente com *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis em ensaios com três horas de contato e depois utilizando uma concentração abaixo da considerada eficiente nos ensaios anteriores para os tempos de 0, 6, 24 e 48 horas de contato.

Neste estudo iniciamos também uma fase importante das pesquisas em alimentos que foi a verificação do grau de aceitação de hambúrguer acrescidos destes mesmos óleos através de análise sensorial utilizando a escala hedônica de nove pontos. Nos ensaios com 3 horas de contato, o OE de manjerona foi o que apresentou melhor eficiência antimicrobiana enquanto o de manjericão foi o menos eficiente. Verificamos também que nas amostras de hambúrguer o NaCl aparentemente agiu de forma aditiva requerendo menores concentrações de OE. Nos ensaios de variação temporal o OE de orégano foi capaz de zerar as contagens em três dos quatro modelos de variação temporal estudados. Em relação a análise sensorial para amostras de hambúrgueres analisado crus não houve rejeição quanto aos aspectos cor e textura. Para as amostras grelhadas, duas adições de óleos se destacaram: manjerona a 0,03% v/g tendo melhor média

de aceitação (7,33) e tomilho a 0,05%v/g a pior média (4,25). Na Figura 9 são mostrados resultados obtidos de acordo com a análise sensorial para amostras de hambúrguer preparados com os respectivos óleos essenciais.

Assim, como conclusão importante reportamos que as concentrações aceitas nos testes sensoriais não correspondem às consideradas eficientes nos testes de sensibilidade antimicrobiana.

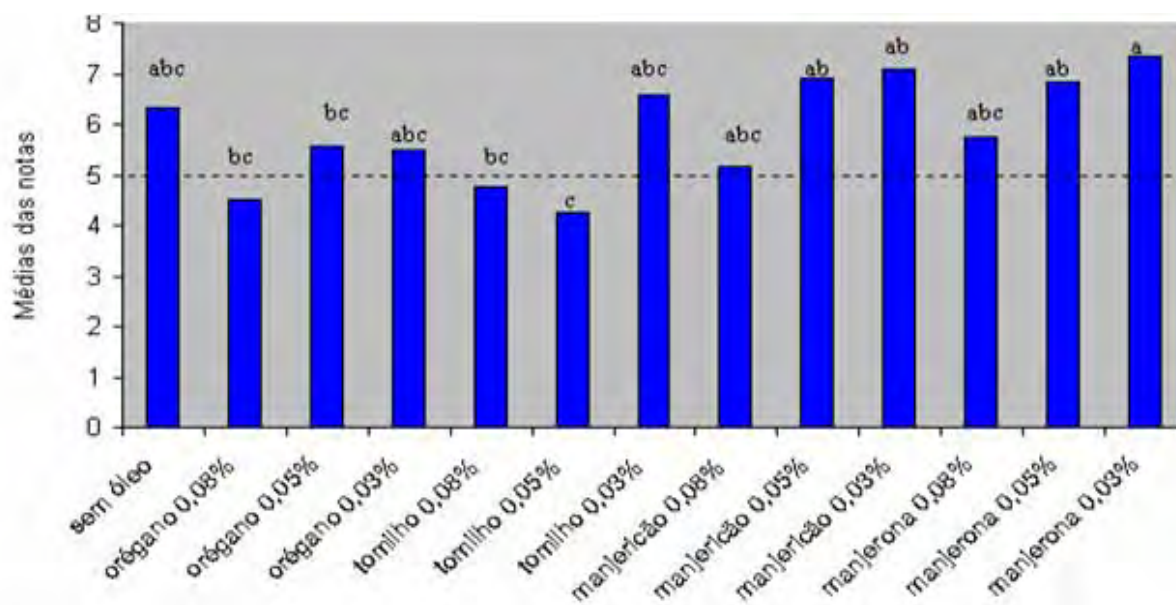


Figura 9. Valores médios atribuídos por avaliadores durante os testes de aceitação global das amostras de hambúrguer grelhado. Alinha referente ao valor cinco refere-se ao índice não gostei e nem desgostei (Fonte. BARBOSA, 2010).

Outro aspecto importante do estudo de **Barbosa (2010)** foi à caracterização química dos óleos utilizados nos ensaios. Assim, verificou-se que os respectivos compostos majoritários estabelecidos, são mencionados na literatura como tendo uma significativa influência sobre a membrana bacteriana alterando sua permeabilidade e estrutura. Assim, a utilização efetiva dos óleos essenciais em alimentos ainda necessita de estudos, visando determinar interações com os constituintes dos alimentos, e estabelecer modelos para otimização do efeito antimicrobiano bem como os níveis tolerados para o seu consumo.

Ainda nesta linha de pesquisa sobre óleos essenciais como aditivo em alimentos, em orientação de doutoramento defendido em julho de 2011 (**FENIMAN, 2011**), testamos óleos essenciais sob vários aspectos, porém, utilizando como modelo alimentar o leite fermentado. De forma geral o estudo teve por objetivos: **a)** identificar e registrar as preferências do público consumidor para alimentos

adicionados de óleos essenciais; **b)** avaliar a ação antimicrobiana do OE de canela em iogurte, adicionado em concentração máxima aceitável sensorialmente (CMAS) e associado com EDTA e/ou polietilenoglicol; **c)** verificar a existência de ação antimicrobiana dos OEs de canela, cravo e menta na CMAS contra o *Lactobacillus rhamnosus* e cultura *starter* de iogurte durante a vida de prateleira de leite fermentado; **d)** determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e visualizar os efeitos do OE de canela contra o *L. rhamnosus*. Os OEs foram obtidos por destilação a vapor no nosso laboratório e caracterizados quimicamente por cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

A primeira parte deste projeto consistiu em pesquisa de mercado para determinar a melhor associação de OEs com o sabor de frutas no iogurte e os óleos mais associados ao queijo. A máxima concentração aceitável de OE (estipulado na pesquisa de mercado) para o iogurte foi determinada na análise sensorial pela Escala Hedônica de zero a nove pontos, com amostras de concentrações crescentes de OE, tendo-se como referencial de aceitação a mediana mínima igual a 7 pontos, referente ao *gostei moderadamente*. Nessa concentração foi verificada a ação antimicrobiana do óleo essencial isoladamente e associado com EDTA, polietilenoglicol e ambos, além do tratamento controle. Foram realizadas as contagens de aeróbios mesófilos totais, psicrotróficos e bolores e leveduras.

A segunda parte do projeto consistiu na realização da curva de sobrevivência do *L. rhamnosus* e cultura *starter* em leite fermentado, isolados e associados, sendo realizadas contagens microbianas dos tratamentos controle e tratados com a CMAS dos óleos de canela, cravo e menta. Os tempos de análise em horas foram de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 13, 21, 29, 37, 55, 73, 168 (7 dias), 136 (14 dias), 504 (21 dias) e 672 (28 dias) horas após o início de fermentação e adição dos óleos. Determinações de acidez titulável foram realizadas nos tempos 0, 5, 7, 168 (7 dias) e 672 (28 dias) horas. E a terceira e parte do projeto consistiu na análise de microscopia eletrônica de transmissão para a cultura de *L. rhamnosus* tratada por 2 horas com 0,04 e 1,0% de OE de canela, juntamente com a contagem de células viáveis após 2 horas (momento da análise microscópica) e após 24 horas. O OE de canela apresentou 67,58% de cinamaldeído como componente majoritário. Foi associado ao sabor banana no iogurte e a CMAS foi de 0,04%. Entretanto, nessa concentração não foi detectada ação antimicrobiana significativa

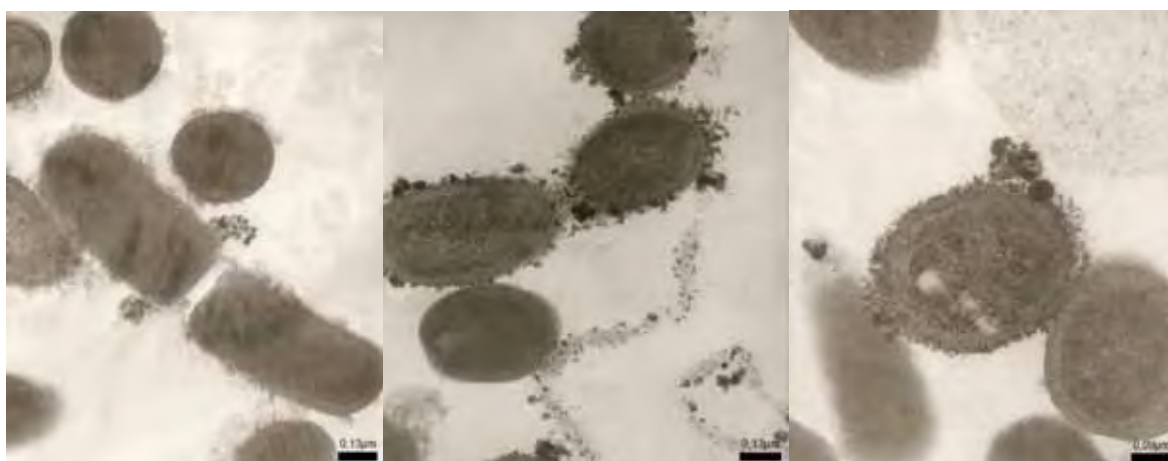
nas contagens microbianas totais do iogurte em relação ao controle, mesmo quando o OE foi associado com o EDTA, o polietilenoglicol e ambos. Os OEs de canela, cravo e menta não interferiram na contagem de *L. rhamnosus*, mas observou-se redução significativa na cultura *starter* e acidez titulável nos tratamentos adicionados com os OEs quando comparados ao controle.

Até o momento, dentre os 4 artigos originados deste trabalho de doutoramento, destacamos inicialmente **Feniman et al. (2012) (disponível on line)**, cujo objetivo foi verificar os efeitos da adição de óleo essencial de canela sobre a bactéria *L. rhamnosus* ATCC 9595. A concentração de 0,04% desse óleo exerceu atividade bacteriostática durante a incubação de 2 horas, apresentando alterações leves na estrutura celular, mas foi considerada bactericida por possibilitar uma redução significativa após 24 horas. Já a concentração de 1,00% reduziu 3 log após 2 horas de incubação e não foi detectada contagem de células viáveis após 24 horas. As observações por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 7) revelaram que as células tratadas com 1,00% de OE de canela foram drasticamente danificadas, apresentando rupturas da membrana celular e extravasamento citoplasmático. Essas observações revelam-se negativas para o uso de OEs em alimentos probióticos, já que é indesejável a ação bactericida contra o *L. rhamnosus*. Assim sendo, a utilização de óleos essenciais em alimentos merece sempre uma avaliação criteriosa, pois como visto no presente estudo, a interferência com a viabilidade de bactérias em alimentos probióticos representa um grande obstáculo para este uso.

Outro artigo originado da tese de **FENIMAN (2011)**, cujo objetivo foi verificar o perfil de sensibilidade do *L. rhamnosus* e cultura *starter* de iogurte em leite fermentado com adição de OE de canela, cravo e menta seguida de contagens bacterianas durante o período de 28 dias de estocagem, visando traçar a curva de sobrevivência de *L. rhamnosus* e cultura *starter* (isolados e associados) através da adição de OEs na concentração de 0,04% (v/v). Esta concentração foi definida previamente como sendo a máxima aceitável organolepticamente após análise sensorial realizada previamente para amostras de leite fermentado.



Células de *L. rhamnosus* (controle) fotografadas por microscopia eletrônica. (a) aumento de 8400x. (b) aumento de 11500x. (c) aumento de 31000x.



Células de *L. rhamnosus* tratadas com 1,00% de OE de canela fotografadas por microscopia eletrônica. (a) aumento de 15500x. (b) aumento de 15500x. (c) aumento de 21500x.

Figura 10. Imagens das alterações por microscopia eletrônica de transmissão verificada em células de *Lactobacillus. rhamnosus* provocada por ação de concentrações distintas de óleo essencial de canela (FENIMAN, 2011; FENIMAN et al., 2012 -disponível on line)

Verificamos que o OE de canela apresentou maior atividade antimicrobiana, principalmente contra a cultura *starter*, interferindo na produção de ácido láctico. As contagens de células viáveis de *L. rhamnosus* foram menores em relação aos controles nos tratamentos com os três OEs, mas não foram diferentes estatisticamente, mantendo-se acima da contagem mínima de 10^6 UFC/ml. Nesse caso, a aplicação do OE de canela em iogurte inviabiliza a fermentação da cultura *starter*, mas não desfavorece a aplicação do *L. rhamnosus* em leite fermentado probiótico. Além disso, os OEs de cravo e menta causaram *stress* subletal para o *L. rhamnosus*.

Para finalizar os comentários feitos, consideramos que nossas pesquisas sobre o uso dos óleos essenciais como aditivo em alimentos ainda encontra-se em fase bastante preliminar e que muito ainda deveremos avançar no sentido de estabelecer de forma segura o uso destes produtos naturais. Isto envolverá obrigatoriamente realização de estudos aprofundados sobre aceitação destes tipos de produtos em alimentos bem como estudos toxicológicos para confirmar a segurança inerente ao seu uso. Isto tudo envolve parcerias juntamente com grupos multidisciplinares, fato este que vai se consolidando em função do tempo.

Assim sendo, consideramos a realização desta linha de pesquisa até o presente momento uma pequena colaboração no sentido de, sem qualquer pretensão de eliminar o uso dos aditivos convencionais, oferecer outras possibilidades tecnológicas ao setor produtivo por entendermos que questões relacionadas à segurança alimentar é bastante complexa e que todas as alternativas visando incrementar a produção alimentar é sempre bem vinda.

6. ANEXOS DAS PUBLICAÇÕES SOBRE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE PLANTAS.

A sequência de artigos apresentados a seguir representa uma parte das publicações com derivados antimicrobianos de plantas, segundo ordem cronológica. Algumas publicações mencionadas no texto referem-se a dissertações, teses, monografias de conclusão de curso ou ainda de iniciação científica. Assim, apresento apenas as publicações que considero as mais relevantes de minha linha de pesquisa.

Anexo 1

BETONI, J.E.C, MANTOVANI, R.P., BARBOSA, L.N, DI STASI, L.C, **FERNANDES JÚNIOR, A.** Synergism between plants extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz***, v.101, n. 4, p. 387-390, 2006 .

.

Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases

Joyce Elaine Cristina Betoni, Rebeca Passarelli Mantovani, Lidiane Nunes Barbosa, Luiz Claudio Di Stasi*, Ary Fernandes Junior/†

Departamento de Microbiologia e Imunologia * Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 18618-000 Botucatu, SP, Brasil

*Searches for substances with antimicrobial activity are frequent, and medicinal plants have been considered interesting by some researchers since they are frequently used in popular medicine as remedies for many infectious diseases. The aim of this study was to verify the synergism between 13 antimicrobial drugs and 8 plant extracts – “guaco” (*Mikania glomerata*), guava (*Psidium guajava*), clove (*Syzygium aromaticum*), garlic (*Allium sativum*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), ginger (*Zingiber officinale*), “carqueja” (*Baccharis trimera*), and mint (*Mentha piperita*) – against *Staphylococcus aureus* strains, and for this purpose, the disk method was the antimicrobial susceptibility test performed. Petri dishes were prepared with or without dilution of plant extracts at sub-inhibitory concentrations in Mueller-Hinton Agar (MHA), and the inhibitory zones were recorded in millimeters. In vitro anti-*Staphylococcus aureus* activities of the extracts were confirmed, and synergism was verified for all the extracts; clove, guava, and lemongrass presented the highest synergism rate with antimicrobial drugs, while ginger and garlic showed limited synergistic capacity.*

Key words: medicinal plants - *Staphylococcus aureus* - antimicrobial drugs - synergism - Kirby & Bauer method

In a constant attempt to improve their quality of life, men have used plants as source of food, shelter, clothing, medicine, cosmetics, and for seeking relief from hardship of life. Some plants are known as medicinal because they contain active substances that cause certain reactions, from relenting to the cure of diseases, on the human organism (Silva Junior et al. 1994). Knowledge on medicinal plants sometimes means the only therapeutic resource of some communities and ethnic groups (Di Stasi 1996), and their use, especially in South America, contributes significantly to primary health care (Holetz et al. 2002). Infectious diseases still represent an important cause of morbidity and mortality among humans, especially in developing countries. Even though pharmaceutical industries have produced a number of new antimicrobial drugs in the last years, resistance to these drugs by microorganisms has increased. In general, bacteria have the genetic ability to transmit and acquire resistance to drugs used as therapeutic agents (Nascimento et al. 2000).

In vitro studies on plants used in traditional medicine have been carried out in the field of microbiology, especially on pathogenic bacterial growth; and some of these studies were about the antimicrobial activity of *Mikania glomerata* Spreng (“guaco”) (Boyayan 2002, Holetz et al. 2002), *Psidium guajava* L. (guava) (Gnan & Demello 1999, Jaiarj et al. 1999, Nascimento et al. 2000, Ahmad & Beg 2001, Abdelrahim et al. 2002, Holetz et al. 2002, Voravuthikunchai et al. 2004, Qadan et al. 2005), *Syzygium*

aromaticum (L) Merrill & Perry (clove) (Lopez et al. 2005), *Allium sativum* L. (garlic) (Ankri & Mirelman 1999, Ahmad & Beg 2000, Srinivasan et al. 2001, Benkeblia 2004), *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) (Silva Junior et al. 1994, Konning et al. 2004), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) (Cimanga et al. 2002, Di Stasi & Hiruma-Lima 2002), *Mentha piperita* L. (mint) (Silva Junior et al. 1994, Tassou et al. 2000), and *Baccharis trimera* (Less.) DC (“carqueja”) (Avancini et al. 2000).

A recent paper on medicinal plants and antimicrobial activity whose objective was to analyze past, present, and future of medicinal plants to suggested as fundamental the research on plant extract mechanism of action, interactions with antibiotics or with other medicinal plants, and extracts pharmacokinetic profile (Rios & Recio 2005). Research on synergism is very limited and few studies have been reported (Nascimento et al. 2000, Aburjai et al. 2001, Aqil et al. 2005). Thus, in our research, we evaluated in vitro synergism between extracts of *M. glomerata*, *P. guajava*, *S. aromaticum*, *A. sativum*, *C. citratus*, *Z. officinale*, *B. trimera*, and *M. piperita* and antimicrobial drugs utilized against *S. aureus* strains by using the Kirby & Bauer method.

MATERIALS AND METHODS

Plant samples - *M. glomerata*, *P. guajava*, *B. trimera*, *M. piperita*, and *C. citratus* samples were collected in 2004 from an experimental field of the School of Agronomical Sciences, Unesp, Botucatu, São Paulo, Brazil, and the voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Department of Botany, Institute of Biosciences, Unesp. Their leaves were dried at 40°C and triturated in a mechanical mill. *A. sativum*, *S. aromaticum*, and *Z. officinale* samples were obtained from the local commerce in the same year and were used in natura for the extracts preparation.

Financial support: Fapesp

†Corresponding author: ary@ibb.unesp.br

Received 21 January 2006

Accepted 8 May 2006

Preparation of plant extracts - Plant material, dried (*M. glomerata*, *P. guajava*, *B. trimera*, *M. piperita*, *C. citratus*) or not (*A. sativum*, *S. aromaticum*, *Z. officinale*) was ground, extracted with 70% methanol and filtered after 48 h. The plant residue was re-extracted with addition of 70% methanol, and after 24 h it was filtered again. Combined filtrates were concentrated on a rotary evaporator at 45°C for methanol elimination, and the extracts were kept in sterile bottles under refrigerated conditions until use. The extracts' dry weight was obtained by the solvent evaporation and used to determine concentration in mg/ml.

Bacterial strains - Thirty-two *S. aureus* strains were isolated from clinical specimens of newborns admitted to the Neonatal Unit of the Hospital of the School of Medicine, Botucatu, SP, Brazil. Strains were isolated in sheep blood agar and, after identification (Koneman et al. 2005), they were stored in brain heart infusion (BHI) plus agar.

Antimicrobial tests - Before the synergism assays between the plant extracts and the antimicrobial drugs were evaluated, the minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined for 32 *S. aureus* strains by diluting the extracts in Mueller Hinton agar (MHA) media (NCCLS 2004a,b). Petri dishes, controls and with different concentrations of plant extracts (mg/ml), were inoculated with *S. aureus* strains (10^4 CFU) using a Steer's replicator and were incubated at 37°C/24 h. The concentration that inhibited visible growth of each strain (MIC) was recorded, and the MIC 90% was calculated. One-fourth the MIC 90% was considered as the sub-inhibitory concentration of the plant extracts in the synergism assays (Mahon & Mantuselis 1995), which were carried out on 15 *S. aureus* strains, including the ATCC 13565 strain by the disk diffusion method (Kirby & Bauer method) (NCCLS 2004) on MHA media. Thirteen drugs were evaluated: penicillin (PEN; 10 IU), oxacillin (OXA; 1 µg), vancomycin (VAN; 30 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), cephalothin (CFL; 30 µg), cefoxitin (CFO; 30 µg), chloramphenicol (CLO; 30 µg), gentamicin (GEN; 10 µg), netilmicin (NET; 30 µg), tetracycline (TET; 30 µg), erythromycin (ERI; 15 µg), cotrimoxazole (SUT; 25 µg), and ofloxacin (OFX; 5 µg). Two antibiogram sets were performed in duplicate for each *S. aureus* strain in control plates, with plain MHA,

and in plates containing MHA plus one-fourth the MIC 90% of the respective extracts. The diameters (mm) of the each inhibitory zone were recorded after incubation at 37°C/18 h.

Statistical analysis - Results from the synergism assays were subjected to the Wilcoxon nonparametric test to compare the values (mm) of the inhibitory zones obtained by the disk diffusion method (Minitab Statistical Software version 13.32). Results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Characteristics, MIC 90% (mg/ml) against 32 *S. aureus* strains, and one-fourth the MIC 90% values obtained in the synergism assays for the plants and their respective extracts are presented in Table I. Anti-*S. aureus* activity was verified for all the plants. *S. aromaticum* showed the highest activity, followed by *P. guajava*; the lowest activity was recorded for lemongrass. The MIC 90% range was 0.36 mg/ml for clove and 17.84 mg/ml for *C. citratus* and it is not surprising the differences in the antimicrobial activity of plants tested, due to phytochemical properties and differences among species. Although the antimicrobial activities of *C. citratus*, *B. trimera*, and *Z. officinale*, have not been relatively high, synergism assays were carried out for them and the synergism rate of *C. citratus* was as high as that of *S. aromaticum* (Table II).

Antimicrobial mechanisms of the drugs used here were variable and the protein synthesis inhibitors were those that presented strongest synergistic effect (5.2 extracts/drug) together with folic acid (4 extracts/drug) and bacterial cell wall synthesis (3.8 extracts/drug) inhibitors. Inhibitors of the nucleic acid synthesis (2 extracts/drug) showed weak synergism with plant extracts. Among the protein synthesis inhibitors, tetracycline showed synergism with all the extracts, followed by chloramphenicol and netilmicin. The synergistic capacity was promising for the extracts of some plants such as *S. aromaticum*, *C. citratus*, and *P. guajava*, which presented synergism with 11, 11, and 9 drugs, respectively; while garlic and ginger showed synergism with only 3 and 2 drugs, respectively.

The high synergism rate of protein synthesis inhibitors, although an important data, shows the need for more studies concerning the molecular basis of these interactions. Similar results with synergism of protein synthesis

TABLE I

Characteristics, minimal inhibitory concentration 90% (MIC 90%) values, and sub-inhibitory one-fourth the MIC 90% values obtained in the synergism assays for the plants and their extracts used

Scientific name	Common name	Part of the plant used	Efficacy (%)	Extracts' dry Weight (mg/ml)	MIC 90% (mg/ml)	¼ MIC 90% (mg/ml)
<i>Allium sativum</i>	Garlic	Bulbs	-	94.12	5.05	1.26
<i>Baccharis trimera</i>	"Carqueja"	Leaves	55.07	52.75	7.23	1.80
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemongrass	Leaves	25.62	63.87	17.84	4.46
<i>Mikania glomerata</i>	"Guaco"	Leaves	28.48	59.62	3.80	0.95
<i>Psidium guajava</i>	Guava	Leaves	47.68	131.75	0.52	0.13
<i>Syzygium aromaticum</i>	Clove	Flower buds	-	58.75	0.36	0.09
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	Rhizomes	-	11.75	3.56	0.89
<i>Mentha piperita</i>	Mint	Leaves	20.83	11.0	2.20	0.55

(-): for non-dried plants the efficacy was considered 100%.

TABLE II
Synergism rate between antimicrobial drugs and plant extracts against 15 *Staphylococcus aureus* strains by the Kirby and Bauer method

Drug target	Drug	<i>Psidium guajava</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Allium sativum</i>	<i>Mikania glomerata</i>	<i>Baccharis trimera</i>	<i>Zingiber officinale</i>	<i>Mentha piperita</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	Synergism rate (extract/drug)	MEAN
Protein synthesis	TET	x	x	x	x	x	x	x	x	8	5.2
	CLO	x	x	-	x	x	-	x	x	6	
	NET	-	-	-	x	x	x	x	x	5	
	ERI	x	x	-	-	x	-	x	-	4	
	GEN	-	-	x	x	-	-	x	-	3	
cell wall synthesis	VAN	x	x	-	x	x	-	-	x	5	3.8
	PEN	-	x	x	x	x	-	-	x	4	
	OXA	x	x	-	-	-	-	x	x	4	
	CFL	x	x	-	x	-	-	-	x	4	
	AMP	x	x	-	-	-	-	-	x	3	
	CFO	x	x	-	-	-	-	-	x	3	
	SUT	x	x	x	-	-	-	-	x	4	
OFX	-	x	-	-	-	-	-	x	2	2	
Total	13	9	11	3	6	6	2	6	11		

x: synergism when $p \leq 0.05$; (-) no synergism; TET: tetracycline; CLO: chloramphenicol; NET: netilmicin; ERI: erythromycin; GEN: gentamicin; VAN: vancomycin; PEN: penicillin; OXA: oxacillin; CFL: cephalothin; AMP: ampicillin; CFO: cefoxitin; SUT: cotrimoxazole; OFX: ofloxacin.

inhibitors and propolis ethanolic extract of *Apis mellifera* by E-test and disk diffusion methods were reported by Fernandes Junior et al. (2005).

The synergism recorded here to plant extracts with weak action on *S. aureus* growth, such as lemongrass, is an important data since it showed a synergism profile similar to that of the clove extract, considered the most efficient *S. aureus* growth inhibitor in this study. Thus, the researchers should investigate the synergistic capacity of plant extracts or other natural products, independent of the antimicrobial activity they have. Therefore, the results of the present study seem to be promising and may enhance the natural products uses, showing the potential of these plants in the treatment of infectious diseases caused by *S. aureus*. Future studies on the chemical characteristics of extracts and active components should be carried out for each plant and antimicrobial property, since only crude extracts and their dry weight have been used in MIC determination (expressed in mg/ml) and synergism assays.

In the present study, the antimicrobial activity of plant extracts on *S. aureus* strains were confirmed and synergism was possible with all the antimicrobial drugs tested. Tetracycline presented synergism with all the extracts; and the *C. citratus* extract, although with the lowest antimicrobial activity, presented a synergism profile similar to that of *S. aromaticum*, whose extract showed a relatively high inhibitory capacity on *S. aureus* growth. The possible activities of substances found in plant extracts on ribosome structure and bacterial enzymes inhibition appear to be related with synergism profile between plant extracts and inhibitors of protein synthesis, however, the understanding of synergism mechanism is fundamental to development of pharmacological agents to treat diseases by *S. aureus* using medicinal plants.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr Lin Chau Ming (FCA/Unesp/Boticatu) for providing the plant specimens supply; Dr Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha for *S. aureus* strains and Dr Lidia Raquel de Carvalho (IBB/UNESP/Boticatu) for the statistical analysis.

REFERENCES

- Abdelrahim SL, Almagboul AZ, Omerb MEA, Elegamib A 2002. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Fitoterapia* 73: 713-715.
- Aburjal T, Darwish RM, Al-Khalil S, Mahgzah A, Al-Abddi A 2001. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ethnopharmacol* 76: 39-44.
- Ahmad I, Beg AZ 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol* 74: 113-123.
- Ankri S, Mirehman D 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microb Infect* 2: 125-129.
- Aqil F, Khan MSA, Owais M, Ahmad I 2005. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol* 45: 106-114.
- Avancini CAM, Wiest JM, Mundstock E 2000. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less.) D.C. - Compositae decocto, as disinfectant or antiseptic. *Arq Bras Med Vet Zootec* 52: 230-234.
- Benkeblia N 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss u Technol* 37: 263-268.
- Boyayan M 2002. O guaco, planta nativa da mata Atlântica, tem mais propriedades terapêuticas do que se supunha. *Rev Pesquisa FAPESP* 74: 48-49.
- Cheeptham N, Towers GHN 2002. Light-mediated activities of

- some Thai medicinal plant teas. *Fitoterapia* 73: 651-662.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, de Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck AJ 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 79: 213-220.
- Di Stasi LC 1996. Arte, ciência e magia. In LC Di Stasi, CA Hiruma-Lima (eds), *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência*, Unesp, São Paulo, p. 15-21.
- Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA 2002. *Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica*, 2nd ed., Unesp, São Paulo, 604 pp.
- Fernandes Junior A, Balestrin ECC, Betoni JEC, Orsi RO, Cunha MLR, Montelli AC 2005. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 563-566.
- Gnan SO, Demello MT 1999. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous goiaba extracts. *J Ethnopharmacol* 68: 103-108.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- Jairj P, Khoohaswan P, Wongkrajjan Y, Peungvicha P, Suriyong P, Sumal Saraya ML, Ruangsomboon O 1999. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. *J Ethnopharmacol* 67: 203-212.
- Koneman EW, Allen SD, Janda NM, Schreckemberger PC, Winn Jr WC 2005. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*, 5th ed., Medis, Rio de Janeiro, 1465 pp.
- Konning GH, Ayare C, Ennison B 2004. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia* 75: 65-67.
- López P, Sánchez C, Batlle R, Nerin C 2005. Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J Agric Food Chem* 53: 6939-6946.
- Mahon CR, Manuselis Jr G 1995. *Textbook of Diagnostic Microbiology*, WB, Saunders, Philadelphia, 1134 pp.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 31: 247-256.
- NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004a. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically, 7th ed., Approved Standard M7.A6, Wayne, Pennsylvania.
- NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004a. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7th ed., Approved Standard M2-A8, Wayne, Pennsylvania.
- Qadan F, Thewasmi AJ, Ali DA, Afifi R, Elkhawad A, Matalka KZ 2005. The antimicrobial activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to acne-developing organisms. *Am J Clin Med* 33: 197-205.
- Rios JL, Recio MC 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100: 80-84.
- Silva Junior AA, Vizotto VJ, Giorgi E, Macedo SG, Marques LF 1994. Plantas medicinais, caracterização e cultivo. *EPAGRI. Bol Técnico Florianópolis* 68: 1-71.
- Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perunalsamy PL 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacol* 74: 217-220.
- Tassou CC, Koutsoumanis K, Nychas GJE 2000. Inhibition of *Salmonella enteridis* and *Staphylococcus aureus* on nutrient broth by mint essential oil. *Food Res Internat* 48: 273-280.
- Voravuthikuchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Ethnopharmacol* 94: 49-54.

Anexo 2

USHIMARU, P.I., DA SILVA M.T., Di STASI, L.C., BARBOSA, L.,
FERNANDES JÚNIOR, A. Antibacterial activity of medicinal plant
extracts. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v. 38, n.04, p.717-719,
2007.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS

Priscila Ikeda Ushimaru¹; Mariama Tomaz Nogueira da Silva¹; Luiz Cláudio Di Stasi²; Luciano Barbosa³; Ary Fernandes Junior^{1*}

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil; ²Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil; ³Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

Submitted: February 14, 2007; Returned to authors for corrections: May 19, 2007; Approved: September 27, 2007.

SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the *in vitro* antimicrobial activity of methanolic extracts of some medicinal plants against *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* sp. The methanolic extract of *Caryophyllus aromaticus* presented the highest anti-*S. aureus* activity and was effective against all bacterial strains tested.

Key words: medicinal plants, antibacterial activity, Minimal Inhibitory Concentration

Further acquaintance with different ethnic groups has contributed to the development of research on natural products, to the increase in knowledge about the close relationship between the chemical structure of a certain compound and its biological properties, and to the understanding of the animal/insect-plant interrelation (8). For these reasons, medicinal plants are important substances for the study of their traditional uses through the verification of pharmacological effects and can be natural composite sources that act as new anti-infectious agents.

The present study aimed at evaluating the *in vitro* antimicrobial activity of plant (*Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Caryophyllus aromaticus*, *Cymbopogon citratus*, *Mikania glomerata* and *Psidium guajava*) extracts against Gram-positive and Gram-negative bacterial strains isolated from human infections.

For the preparation of plant extracts, samples of *A. sativum* (bulbs), *Z. officinale* (rhizomes) and *C. aromaticus* (flower buds) were obtained at the local commerce in April 2006 and used *in natura*. *Cymbopogon citratus* (leaves) and *Psidium guajava* (leaves) were collected in May 2006 from an experimental field of the School of Agronomical Sciences, Unesp, Botucatu, São Paulo, Brazil. *Mikania glomerata* (leaves) was collected around

Demétria farm, Botucatu, São Paulo, during the same period. The leaves were dried at approximately 50°C and triturated in a mechanical mill. The voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Department of Botany, Institute of Biosciences, Unesp, Botucatu-SP.

The determined plant parts (200g) were ground, extracted with 70% methanol and filtered after 48hs. The plant residue was re-extracted by adding 70% methanol and filtered again after 48hs. Such procedure was repeated every 72hs, completing three filtration processes. The filtrate was concentrated on a rotary evaporator at 45°C for methanol elimination, and the extracts were kept in sterile bottles under refrigerated conditions until use. The dry weight of the extracts was obtained by allowing the solvent to evaporate and was used to determine concentration in mg/mL. (Methodology based on Betoni *et al.* (3); Table 1).

Microbial susceptibility assays using the agar dilution (Mueller-Hinton Agar) method (%v/v and corresponding mg/mL values) and the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) were carried out for fifteen *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus*, *Enterococcus* sp and *E. coli* strains plus one ATCC strain of each bacterium. Overnight cultures (37°C) in Brain Heart

*Corresponding Author. Mailing address: Departamento de Microbiologia e Imunologia, IBB/UNESP, Botucatu, SP, Brasil. Tel: (14) 3811-6058 FAX (14) 3815-3744. E-mail: ary@ibb.unesp.br

Ushimaru, P.I. *et al.***Table 1.** Characteristics of the plants extracts.

Scientific name	Common name	Part of the plant used	Extract dry weight (mg/mL)
<i>Allium sativum</i>	Garlic	Bulbs	133.0
<i>Caryophyllus aromaticus</i>	Clove	Flower buds	95.0
<i>Zingiber officinale</i>	Ginger	Rhizomes	17.0
<i>Psidium guajava</i>	Guava	Leaves	122.0
<i>Cymbopogon citratus</i>	Lemongrass	Leaves	75.0
<i>Mikania glomerata</i>	"Guaco"	Leaves	70.0

Infusion (BHI) were adjusted to 0.5 Mac Farland standard and inoculated on Petri plates by using a Steer's replicator. After 37°C/24 hours, MIC values (4,6) were read and MIC 50% and 90% values calculated. Kruskal-Wallis test for significant analysis ($p < 0.05$) and Dunn's Test for multiple comparisons were carried out. Then, the results mean values, which represent the inhibitory capacity of each plant extract against the bacteria tested, were obtained and expressed as %v/v and mg/mL (Table 2).

MIC 90% values were different among extracts. Garlic and ginger extracts showed high antimicrobial action against Gram-negative strains. Gram-positive bacteria were more susceptible to the other plant extracts. Clove extracts were highly effective against bacterial strains, especially *S. aureus* strain (Table 2).

The antimicrobial properties of medicinal plants has been explained by the chemical association of active substances; however, the activity of their extracts is not related to their respective dry weights, which can be proven when more

Table 2. Minimal inhibitory concentrations (MIC 50% and 90%) and mean values (%v/v and mg/mL) according to the plant extracts against *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* sp.

Plant Extracts	Bacteria spp.	<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus</i> sp	
		%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL
Garlic	MIC50%	1.00	1.33	1.06	1.41	2.00	2.66	3.25	4.32
	MIC90%	1.04	1.38	1.21	1.61	2.00	2.66	3.67	4.88
	Median	1.000 a	1.330 a	1.100 a	1.460 a	2.000 b	2.660 b	3.375 a	4.485 b
Clove	MIC50%	1.22	1.16	1.60	1.52	0.41	0.39	1.15	1.09
	MIC90%	1.68	1.60	1.76	1.67	0.49	0.46	1.31	1.24
	Median	1.800 a	1.710 a	1.800 a	1.710 a	0.500 a	0.470 a	1.350 a	1.280 a
Guava	MIC50%	3.70	4.51	1.90	2.32	0.55	0.67	1.25	1.52
	MIC90%	7.40	9.03	2.18	2.66	0.63	0.77	1.43	1.74
	Median	4.000 a	4.880 b	2.250 a	2.740 a	0.650 a	0.790 a	1.250 a	1.520 a
Guaco	MIC50%	30.00	21.00	30.00	21.00	4.67	3.27	12.86	9.00
	MIC90%	32.33	22.63	30.00	21.00	6.20	4.34	15.14	10.60
	Median	30.000 b	21.000 c	30.000 b	21.000 c	5.000 b	3.500 b, c	15.000 b	10.500 c, d
Lemongrass	MIC50%	40.00	30.00	40.37	30.28	19.00	14.25	17.50	13.12
	MIC90%	40.80	30.60	40.87	30.65	21.80	16.35	21.20	15.90
	Median	40.500 b	30.375 c	41.000 b	30.750 c	19.500 c	14.625 d	18.250 b	13.685 d
Ginger	MIC50%	41.00	6.97	41.00	6.97	45.11	7.67	46.00	7.82
	MIC90%	41.00	6.97	41.00	6.97	45.82	7.79	46.00	7.82
	Median	41.000 b	6.970 b	41.000 b	6.970 b	46.000 d	7.820 c	46.000 c	7.820 b, c

Letters a, b, c and d: Means in the same column not followed by the same letter are significantly different ($p < 0.001$).

effective extracts are considered, e.g. clove extract (95 mg/mL) which had relatively lower activity than guava (122 mg/mL) and garlic (133 mg/mL) extracts, and all these extracts showed similar antimicrobial activity patterns. Such results were different from data reported in literature. Samy (7) used methanolic extracts of ginger which did not present antimicrobial effect against *S. aureus* and *E. coli*. However, Indu *et al.* (5), using a different method of ginger extract preparation, verified an inhibitory action against *E. coli* as well as high antimicrobial activity of garlic extracts against *E. coli* and *Salmonella*.

Almad and Aqil (2) concluded that ethanolic extracts of garlic did not have anti-*E. coli* or anti-*Shigella* action. Using another methodology, Vuddhakul *et al.* (9) observed that garlic extracts inhibited the growth of *V. parahaemolyticus*, *E. coli* and *S. aureus*; however, lemongrass and ginger extracts did not show any antimicrobial activity. Such behavior of the antibacterial action was also verified by Adonizio *et al.* (1), who used lemongrass extracts and did not observe antibacterial effects.

Comparisons with pertinent data from literature indicate that, according to the methodology adopted in studies on antimicrobial activity, the most diverse results can be obtained. Plant extracts have shown inhibitory effect on the growth of the bacteria studied, although of distinct forms. It is therefore recommended that the nature and the number of the active antibacterial principles involved in each plant extract be studied in detail.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil). The authors thank Dr. Lin Chau Ming (FCA/Unesp/Botucatu) for providing the plant specimens and Dr. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha (IBB/Unesp/Botucatu) for supplying *S. aureus* strains.

RESUMO

Atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais

Avaliou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos metanólicos de algumas plantas medicinais frente a *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp. O extrato metanólico de *Caryophyllus aromaticus* foi o mais eficaz para todas as bactérias testadas e apresentou a melhor atividade anti-*S. aureus*.

Palavras-chave: plantas medicinais, atividade antibacteriana, concentração inibitória mínima

REFERENCES

1. Adonizio, A.L.; Downum, K.; Bennett, B.C.; Mathee, K. (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J. Ethnopharmacol.*, 105: 427-435.
2. Almad, I.; Aqil, F. (2007). In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESβL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiol. Res.*, 162: 264-275.
3. Betoni, J.E.C.; Mantovani, R.P.P.; Barbosa, L.N.; Di Stasi, L.C.; Fernandes Junior, A. (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 101: 387-390.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifteenth informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA, USA.
5. Indu, M.N.; Hatha, A.A.M.; Abirosh, C.; Harsha, U.; Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz. J. Microbiol.*, 37: 153-158.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Sixth Edition - NCCLS document M7-A6. Wayne, PA, USA.
7. Samy, R.P. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plants from India. *Fittoterapia.*, 76: 697-699.
8. Viegas, C.; Bolzani, V.S. (2006). Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, 29: 326-337.
9. Vuddhakul, V.; Bhooponga, P.; Hayeebilna, F.; Subhadhirasakulb, S. (2007). Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiol.*, 24: 413-418.

Anexo 3

BARBOSA, L.N., RALL, V.L.M., FERNANDES, A.A.H., USHIMARU, P.I., PROBST, I.S., **FERNANDES JÚNIOR, A.** Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. ***Foodborne Pathogens and Disease***, v. 6, n. 6, p. 725-728, 2009.

Short Communication

Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat

Lidiane Nunes Barbosa,¹ Vera Lucia Mores Rall,¹ Ana Angélica Henrique Fernandes,² Priscila Ikeda Ushimaru,¹ Isabella da Silva Probst,¹ and Ary Fernandes Jr.¹

Abstract

The antimicrobial activity of essential oils of oregano, thyme, basil, marjoram, lemongrass, ginger, and clove was investigated *in vitro* by agar dilution method and minimal inhibitory concentration (MIC) determination against Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) and Gram-negative strains (*Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis). MIC_{90%} values were tested against bacterial strains inoculated experimentally in irradiated minced meat and against natural microbiota (aerobic or facultative, mesophilic, and psychrotrophic bacteria) found in minced meat samples. MIC_{90%} values ranged from 0.05%v/v (lemongrass oil) to 0.46%v/v (marjoram oil) to Gram-positive bacteria and from 0.10%v/v (clove oil) to 0.56%v/v (ginger oil) to Gram-negative strains. However, the MIC_{90%} assessed on minced meat inoculated experimentally with foodborne pathogen strains and against natural microbiota of meat did not show the same effectiveness, and 1.3 and 1.0 were the highest log CFU/g reduction values obtained against tested microorganisms.

Introduction

THE NEW TECHNOLOGIES of food preservation include nonthermal inactivation, such as ionization radiation, high hydrostatic pressure, and pulsed electric fields; modified atmosphere and active packaging; biopreservation; and natural antimicrobial compounds (Devlieghere *et al.*, 2004). Plants are a source of bioactive molecules and have been widely used both traditionally and commercially to increase the shelf-life and safety of foods (Sasidharan *et al.*, 2008).

Biological properties of essential oils and their antimicrobial activity have been attributed to phenolic compounds, such as the carvacrol, eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol), and thymol (Seydim and Sarikus, 2006). These compounds have hydrophobic characteristics and interact with different sites of microbial cell (e.g., cell wall and cytoplasmic membrane), causing loss of cellular constituents, collapse of membrane structure, and cell death (Burt, 2004). Bactericidal or bacteriostatic activity of essential oils, *in vitro* and in food assays, against

Salmonella enterica, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Candida albicans* strains has been reported (Lambert *et al.*, 2001; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). Studies *in vitro* have used spices as antimicrobials in laboratory media although the levels of spices and their essential oils to inhibit microorganisms in food have been found to be higher than those assays performed using culture media (Burt and Reinders, 2003; Uhart *et al.*, 2006).

Thus, we aimed to determine *in vitro* the minimal inhibitory concentration (MIC) of essential oils from *Thymus vulgaris* (thyme), *Origanum majorana* (marjoram), *Origanum vulgare* (oregano), *Ocimum basilicum* (basil), *Zingiber officinale* (ginger), *Cymbopogon citratus* (lemon grass), and *Caryophyllus aromaticus* (clove) against *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, and *Salmonella* Enteritidis strains. MIC_{90%} values were evaluated in minced meat irradiated and experimentally inoculated with these pathogenic bacteria and against natural microbiota of minced meat (mesophiles and psychrotrophs).

Departments of ¹Microbiology and Immunology and ²Chemistry and Biochemistry, Biosciences Institute, São Paulo State University, Sao Paulo, Brazil.

ESSENTIAL OILS AND FOOD PRESERVATION

727

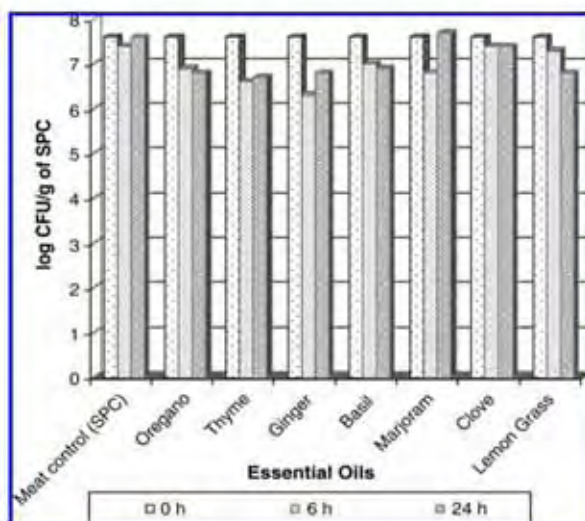


FIG. 2. Log of CFU/g of standard plate count (SPC) values recorded on minced meat samples after 5°C/6 and 24h of essential oil addition.

oils and clove oil for Gram-negative strains (0.10%v/v). *In vitro* studies have demonstrated the antibacterial activity of essential oils against *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, and *S. aureus*, and Gram-negative bacteria were less susceptible than Gram-positive bacteria (Burt, 2004).

The CFU/g (log) values of *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, and *Salmonella* Enteritidis assays with or without essential oil contact in meat experimentally inoculated are shown in

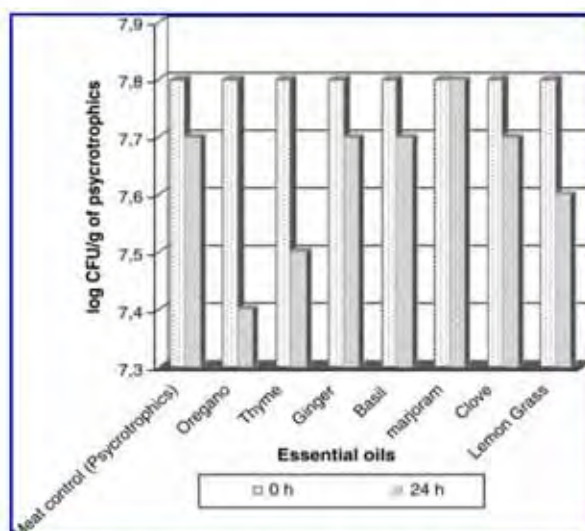


FIG. 3. Log of CFU/g for psychrotrophic microorganism values recorded on minced meat samples after 5°C/24h of essential oil addition.

Fig. 1. The reduction between tests and control treatments was not significant, and the oils were able to reduce 1 log compared with the control. Although no significant differences were found, the bacteriostatic effect of oils was verified, and no bacterial developments were recorded at 5°C/3h for all bacterial strains.

The log CFU/g values for mesophilic aerobic bacteria from minced meat recorded at 0 h (positive control) and 6 and 24 h after adding oil to meat are presented in Fig. 2. No significant differences were verified, and 1.3 and 1.0 were log CFU/g reduction values to ginger and thyme oils, respectively. The psychrotrophic reduction tests (Fig. 3) after 24 h of oils and meat contact produced the highest log reduction with oregano oil (0.4).

Although the antimicrobial activity *in vitro* of oils has been moderately effective on meat model, the potential use of these oils in food preservation technologies should be found in optimal concentrations to ensure the safety of the food, appropriated organoleptical characteristics, and accepted by consumers. Studies aiming to elucidate the interaction between essential oils and components of food matrices or additives, stability of oils during food processing, and the standardization of antibacterial methods are still needed.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP 05/56110-2 and 05/55039-2). We thank the Companhia Brasileira de Esterilização (CBE) for meat sample irradiation, Dr. Luciano Barbosa for statistical analysis, and Dr. José Mauricio Sforzin for critical review of the article.

References

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94: 233–253.
- Burt SA and Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O 157:H7. *Lett Appl Microbiol* 2003;36:162–167.
- Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Nychas G, and Haroutounian SA. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 2004;52:8261–8267.
- Devlieghere F, Vermeiren L, and Debevere J. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int Dairy J* 2004;14: 273–285.
- Friedman M, Henika PR, Levin CE, and Mandrell RE. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem* 2004;52:6042–6048.
- Kim JW, Kim YS, and Kyung KH. Inhibitory activity of essential oils garlic an onion against bacteria and yeasts. *J Food Prot* 2004;67:499–504.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, and Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* 2001;91:453–462.
- [NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 7th edition. Approved Standard M7.A6. NCCLS: Wayne, PA, 2004.

728

- Sasidharan S, Zuraini Z, Yoga Latha L, Sngetha S, and Suryani S. Antimicrobial activities of *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC extracts. *Food Pathog Dis* 2008;5:303-309.
- Seydin AC and Sarikus G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int* 2006;39: 639-644.
- Uhart M, Maks N, and Ravishankar S. Effect of spices on growth and survival of *Salmonella* Typhimurium DT 104 in ground beef stored at 4 and 8°C. *J Food Saf* 2006;26:115-125.

BARBOSA ET AL.

Address correspondence to:
Ary Fernandes Jr., Ph.D.
Department of Microbiology and Immunology
Biosciences Institute
São Paulo State University
IBB/UNESP/Botucatu
Sao Paulo 18618-000
Brazil
E-mail: ary@ibb.unesp.br

Anexo 4

ZAGO, J.A.A., USHIMARU, P.I., BARBOSA, L.N., **FERNANDES JÚNIOR, A.** Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylooccus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. ***Brazilian Journal of Pharmacognosy***, v.19, n.04., p. 828-833, 2009.



Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos

Juliana A. A. Zago,¹ Priscila I. Ushimaru,¹ Lidiane N. Barbosa,¹ Ary Fernandes Junior^{*,1}

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Distrito Rubião Junior, 18.610-000 Botucatu-SP, Brasil

RESUMO: Estudos com plantas e utilização em terapias combinatórias têm sido estimulados. Verificou-se as possíveis interações entre óleos essenciais de plantas [canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume Lauraceae), capim-cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Poaceae], hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L. Lamiaceae), gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe Zingiberaceae), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L. Myrtaceae) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L. Lamiaceae)] combinados a oito drogas antimicrobianas frente a doze linhagens de *Staphylococcus aureus* e doze de *Escherichia coli* isoladas de humanos. Após determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os óleos pelo método da diluição foram realizados ensaios para verificação de sinergismo entre os óleos essenciais e os antimicrobianos pela metodologia de Kirby & Bauer. *S. aureus* foi mais suscetível às interações óleos e drogas, tendo o óleo de capim cidreira apresentado sinergismo com as oito drogas testadas, seguido pelo óleo de hortelã com sete drogas. Nos ensaios com *E. coli*, houve sinergismo apenas para os óleos de alecrim (três drogas) e capim-cidreira (duas drogas). Não ocorreram casos de antagonismo e os resultados de sinergismo foram influenciados pelos microrganismos estudados.

Unitermos: Drogas antimicrobianas, bactérias, óleos essenciais, plantas medicinais, sinergismo.

ABSTRACT: "Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections". The studies with plants and combinatory therapy have been stimulated. The interactions between cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume Lauraceae), lemon grass [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Poaceae], mint (*Mentha piperita* L. Lamiaceae), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe Zingiberaceae), clove (*Caryophyllus aromaticus* L. Myrtaceae) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L. Lamiaceae) and eight antimicrobial drugs against twelve *S. aureus* and twelve *E. coli* strains isolated from human specimens were evaluated. After minimal inhibitory concentration (MIC) values determination of essential oils by dilution agar method, the synergism assays were performed by Kirby and Bauer method. The *S. aureus* was susceptible to oils and drugs interactions, and the lemon grass oils showed synergism with all drugs tested followed by mint with seven drugs. *E. coli* assays, synergism was observed only with rosemary (three drugs) and lemon grass (two drugs). No antagonism between drugs and oils tested was observed and the results were variable according to microorganism used.

Keywords: Antimicrobial drugs, bacteria, essential oils, medicinal plants, synergism.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática antiga e atualmente é predominante em países em desenvolvimento, onde existe uma dependência na denominada medicina popular como solução alternativa para problemas de saúde, especialmente na Ásia, África e América Latina (Sartoratto et al., 2004). A tradição popular também serve como base a farmacologia moderna, sendo que parte das drogas sintéticas atuais tem origem, direta ou indireta, nas plantas medicinais (Silver & Bostian, 1993).

A propriedade antimicrobiana é motivo de

inúmeros estudos devido ao aumento da resistência bacteriana às drogas antimicrobianas convencionais, além do que também são necessários estudos visando entendimento desta propriedade, mesmo para as plantas que já tiveram seu potencial antimicrobiano comprovado (Schelz & Hohmann, 2006). Também já foi verificado que o uso associado de plantas medicinais, além dos seus compostos derivados, e drogas antimicrobianas pode inibir ou intensificar o efeito terapêutico das drogas antimicrobianas convencionais, bem como não interferir na resposta esperada (Nascimento et al., 2000).

Os óleos essenciais são responsáveis por conferir

Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

aroma e sabor característico às plantas e são relacionados à atração de polinizadores, proteção contra insetos e diversas funções necessárias à sobrevivência da planta (Lima et al., 2003; Santos et al., 2004), eles apresentam composição complexa, sendo os terpenos considerados a classe de substâncias mais encontrada nas plantas (Santos et al., 2004). A composição química do óleo pode apresentar variação devida à fatores ambientais e de manejo das plantas bem como da forma de extração e armazenamento, interferindo na atividade antimicrobiana (Nascimento et al., 2007).

A escolha da planta para utilização do seu óleo essencial é feita tendo como critério o seu uso terapêutico e etnobotânico, presença de determinadas substâncias ativas ou de acordo com sua disponibilidade (Maciel et al., 2002). Óleo essencial de alecrim apresenta terpenos, especialmente α -pineno e canfeno (Angioni et al., 2004), sendo a ação antimicrobiana verificada frente a linhagens bacterianas e também sobre linhagens de leveduras (Schelz & Hohmann, 2006). Mentol, mentona, mentofurano, terpineno, limoneno, cineol, felandreno e α -pineno são as principais substâncias do óleo essencial da hortelã pimenta. O óleo essencial de capim-cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.] é composto de mirceno, neral, geranial e outras substâncias e é utilizado na medicina popular para o tratamento de resfriados, disenteria, dores de cabeça, tranqüilizante e antiespasmódico (Pereira et al., 2004), sendo frequentes os relatos sobre sua ação antimicrobiana (Nguefack et al., 2004). O uso do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é bem conhecido na culinária como tempero e há muito tempo os chineses já o utilizavam na medicina. Geralmente utilizado no tratamento de disenteria, malária, reumatismo e resfriados, seu óleo é composto por uma diversidade de terpenos (Sabulal et al., 2006). O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) é utilizado como flavorizante, aromatizante e conservante natural de alimentos e estudos mostraram a capacidade de inibir fungos (Lima et al., 2006) e bactérias (Matan et al., 2006). Foram identificados 23 constituintes no óleo essencial obtido de folhas de canela, sendo o eugenol a substância que apresentou maior percentual (60%). A partir de galhos foram identificados 36 substâncias com predominância de monoterpenos α e β -pineno, α -felandreno, p -cimeno, limoneno, linalol, sequeiterpenos α -copaeno, β -cariofileno, oxido de cariofileno e os alilbenzenos ϵ -cinamaldeído e aceto de ϵ -cinamila (Lima et al., 2005). O cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*), pertencente à família Myrtaceae, e seu óleo essencial está presente na planta em grande quantidade, entre 15 e 25%, tendo como principal constituinte o eugenol (Silva, 2006), sendo esta substância de reconhecida atividade antibacteriana e antifúngica, e também o mais ativo quando testado frente a linhagens de *E. coli* (Burt & Reinders, 2003; Rhayour et al., 2003).

Assim, este trabalho buscou estudar as possíveis interações entre determinados óleos essenciais extraídos de plantas consideradas medicinais, como a canela

(*Cinnamomun zeylanicum*), o capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), a hortelã (*Mentha piperita*), o gengibre (*Zingiber officinale*), o cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) e o alecrim (*Rosmarinus Officinalis*), com determinadas drogas antimicrobianas; frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos através de adaptação da metodologia de Kirby & Bauer.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas medicinais e óleos essenciais

As amostras de cravo-da-índia e gengibre foram obtidas no comércio local da cidade de Botucatu-SP e a amostra de capim-cidreira no canteiro de plantas medicinais localizado na Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, sendo a exsicata depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu sob número BOTU 25663. Os óleos foram obtidos pela metodologia do arraste com vapor de água no laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu. Os óleos das demais plantas foram obtidos em empresa especializada na comercialização de produtos desta natureza (Bioessência Produtos Naturais Ltda, Barra Bonita-SP).

Interações entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas

Foram testadas linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* (n = 12) e *Escherichia coli* (n = 12) isoladas a partir de materiais biológicos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu. Previamente as linhagens foram semeadas em meio de Agar Sangue e MacConkey para verificação de viabilidade e pureza das linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizados na realização dos ensaios sobre interações de drogas foram obtidos previamente utilizando a metodologia da diluição dos óleos essenciais em meio de Mueller Hinton Agar (MHA) e posterior cálculo da CIM 90% (NCCLS, 2003; Betoni et al., 2006). Estes valores são apresentados na Tabela 1 juntamente com os valores de ¼ CIM 90, que foram utilizados nos ensaios para verificação de possíveis interações entre os óleos essenciais e as drogas antibacterianas. A metodologia adotada foi a dos discos, preconizadas por Kirby & Bauer (CLSI, 2005) e adaptada por Betoni et al. (2006).

Foram realizados dois tipos de antibiogramas: um controle e um tratamento. Nos tratamentos, os óleos essenciais das plantas foram diluídos (% v/v) em meio de Mueller Hinton Ágar (MHA) obtendo-se concentrações

Juliana A. A. Zago, Priscila I. Ushimaru, Lidiane N. Barbosa, Ary Fernandes Junior

correspondentes à proporção de ¼ da CIM 90%, de acordo com valores obtidos previamente para cada um dos óleos essenciais em estudo (Tabela 1). Para possibilitar a diluição dos óleos essenciais no meio de cultura, foi utilizado Tween 80 na proporção de 0,2% v/v (Nascimento et al., 2007). Após incubação (37 °C/24 h), os halos de inibição foram anotados (milímetros) e na análise estatística foram comparados os valores obtidos nos ensaios controles e tratamentos. Os experimentos foram realizados em duplicatas e utilizados para análise estatística a média dos valores observados. As drogas antimicrobianas testadas foram: cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), cefepima (10 µg), tetraciclina (30 µg), sulfazotrim (25 µg),

cefalotina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e rifampicina (5 µg).

Análise estatística

Para os resultados obtidos através do método de Kirby & Bauer para cada bactéria, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a verificação de possíveis interações entre o óleo essencial (tratamento) e as drogas antibacterianas. Quando a diferença entre a mediana do controle e a do tratamento, para cada droga, era significativa ($p \leq 0,05$), concluía-se a ocorrência de interação.

Tabela 1. Valores de CIM 90% e ¼ CIM 90 expressos em % v/v para *S. aureus* e *E. coli*.

Bactérias	Canela % v/v	Alecrim % v/v	Hortelã % v/v	Cravo % v/v	Gengibre % v/v	Capim cidreira % v/v
<i>S. aureus</i>						
CIM90%	0,047	0,550	0,280	0,095	0,090	0,100
¼ CIM90%	0,011	0,140	0,070	0,024	0,022	0,025
<i>E. coli</i>						
CIM90%	0,090	5,000	1,240	0,083	0,520	0,550
¼ CIM90%	0,022	1,250	0,310	0,021	0,130	0,140

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os valores das medianas encontrados para cada tratamento de acordo com as drogas antimicrobianas, comparando-os com os valores obtidos no antibiograma controle. Através desses resultados, aplicando-se a análise estatística pelo teste de Mann-Whitney, pode-se observar a interferência dos óleos essenciais sobre o poder antibacteriano das drogas testadas (Tabela 4). As linhagens de *S. aureus* mostraram-se mais suscetíveis à interferência dos óleos sobre as drogas antimicrobianas testadas, tendo verificado 26 eventos (54%) de interações do tipo sinergismo, para um total de 48 combinações possíveis (oito drogas x seis óleos). Em

estudo realizado por Oliveira et al. (2006), as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermis*) se mostraram mais sensíveis às interações entre drogas antibacterianas e óleos essenciais selecionados para o estudo. Uma explicação é que as bactérias Gram positivas são mais sensíveis à ação de agentes antimicrobianos devido à presença de uma parede bacteriana que normalmente não restringe a penetração de moléculas tóxicas, enquanto as Gram negativas possuem um sistema de barreira constituído pela membrana externa da parede bacteriana formada por fosfolípidios, lipopolissacarídeos e proteínas (porinas) que conferem considerável impermeabilidade aos agentes antibacterianos, resultando em maior resistência dessas bactérias aos antibióticos (Lambert, 2002).

Tabela 2. Valores das medianas encontrados pelo método de Kirby & Bauer para o controle (C) e para os tratamentos (T) com óleos essenciais frente às drogas antibacterianas para 12 linhagens de *S. aureus*.

Drogas	Canela		Alecrim		Hortelã		Cravo		Gengibre		Capim	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
CLO	23,0	24,0	23,0	24,0	23,0	26,5	23,0	25,0	23,0	24,5	23,0	26,0
CFL	30,0	31,0	30,0	30,5	30,0	33,0	30,0	32,0	30,0	33,0	30,0	39,0
CPM	24,5	25,5	24,5	25,0	24,5	25,5	24,5	24,5	24,5	26,0	24,5	30,0
GEN	23,0	25,0	23,0	25,5	23,0	25,5	23,0	27,0	23,0	26,0	23,0	31,0
TET	24,0	25,0	24,0	26,0	24,0	27,0	24,0	27,0	24,0	26,5	24,0	29,0
SUT	28,0	29,0	28,0	29,5	28,0	30,0	28,0	29,0	28,0	29,0	28,0	30,5
RIF	25,5	27,0	25,5	27,0	25,5	28,0	25,5	28,0	25,5	27,0	25,5	31,5
CIP	28,0	29,5	28,0	29,0	28,0	31,0	28,0	30,5	28,0	30,5	28,0	35,0

CLO: cloranfenicol, CFL: cefalotina, CPM: cefepime, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina, SUT: sulfazotrim, RIF: rifampicina, CIP: ciprofloxacina. Valores em negrito quando diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Tabela 3. Valores das medianas encontrados pelo método de Kirby&Bauer para o controle (C) e para os tratamentos (T) com óleos essenciais frente às drogas antibacterianas para 12 linhagens de *E. coli*.

Drogas	Canela		Alecrim		Hortelã		Cravo		Gengibre		Capim	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
CLO	21,0	24,0	21,0	28,5	21,0	22,5	21,0	23,0	21,0	25,0	21,0	25,0
CFL	16,0	16,0	16,0	15,5	16,0	16,5	16,0	15,5	16,0	16,5	16,0	19,0
CPM	31,5	30,5	31,5	33,5	31,5	32,0	31,5	30,0	31,5	33,0	31,5	35,0
GEN	21,5	21,5	21,5	22,0	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,0	21,5	21,5
TET	14,5	15,5	14,5	23,5	14,5	19,0	14,5	19,0	14,5	14,5	14,5	18,0
SUT	26,0	26,5	26,0	29,0	26,0	28,5	26,0	28,5	26,0	26,5	26,0	28,0
RIF	12,5	14,5	12,5	14,5	12,5	13,0	12,5	13,0	12,5	9,0	12,5	9,5
CIP	31,5	32,5	31,5	34,5	31,5	33,5	31,5	33,5	31,5	33,5	31,5	34,5

CLO: Cloranfenicol, CFL: Cefalotina, CPM: Cefepime, GEN: Gentamicina, TET: Tetraciclina, SUT: Sulfazotrim, RIF: Rifampicina, CIP: Ciprofloxacina. Valores em negrito com diferença significativa $p \leq 0,05$

Tabela 4. Taxa de sinergismo entre drogas antimicrobianas e óleos essenciais junto a 13 linhagens *S. aureus* e *E. coli* pelo método de Kirby & Bauer.

Drogas	Canela		Alecrim		Hortelã		Cravo		Gengibre		Capim		Sinergismo	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
CLO	-	-	-	X	X	-	-	-	X	-	X	-	3	1
CFL	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	X	X	3	1
CPM	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	X	X	1	2
GEN	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	X	-	5	0
TET	-	-	X	X	X	-	-	-	X	-	X	-	4	1
SUT	-	-	X	-	X	-	-	-	-	-	X	-	3	0
RIF	-	-	-	-	X	-	X	-	-	-	X	-	3	0
CIP	-	-	-	-	X	-	X	-	X	-	X	-	4	0
Total	0	0	3	3	7	0	3	0	5	0	8	2		

(X): Sinergismo quando $p \leq 0,05$; (-): Indiferente. CLO: Cloranfenicol, CFL: Cefalotina, CPM: Cefepime, GEN: Gentamicina, TET: Tetraciclina, SUT: Sulfazotrim, RIF: Rifampicina, CIP: Ciprofloxacina.

O óleo essencial de capim cidreira apresentou sinergismo com as oito drogas testadas nos ensaios com *S. aureus*, seguido pela hortelã que apresentou sinergismo com sete drogas e pelo gengibre com cinco drogas. O óleo essencial de canela não apresentou qualquer tipo de interação. A gentamicina apresentou sinergismo com o maior número de óleos testados, sendo cinco dos seis testados enquanto a cefepime apresentou apenas um caso de sinergismo com o óleo de capim cidreira.

Nos ensaios para *E. coli* ocorreram apenas cinco interações com sinergismo entre os óleos essenciais e as drogas testadas, o que correspondeu a apenas 10,4% do total possível de interações, sendo os óleos de alecrim e capim-cidreira os que interferiram na ação antimicrobiana das drogas selecionadas sendo três e dois casos de sinergismo respectivamente. Quanto às drogas antimicrobianas, e contrário ao que ocorreu nos ensaios com *S. aureus*, a cefepime apresentou o maior número de sinergismo verificado com dois dos óleos testados. Também não foram observados casos de antagonismo e confirmou-se a tendência de maior resistência aos antimicrobianos das

linhagens Gram-negativas (Denyer & Maillard, 2002; Lambert, 2002).

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, observa-se uma tendência de interação positiva entre determinadas drogas e óleos essenciais. Para a *S. aureus*, as drogas gentamicina, cefalotina e cefepime tiveram seu perfil de sensibilidade melhorado quando expostas aos tratamentos com óleo essencial de capim cidreira e de hortelã. Seguidos pelos óleos de cravo da Índia e gengibre que interferiram na gentamicina. Em relação a *E. coli*, o cloranfenicol apresentou um aumento considerável no número de linhagens sensíveis quando este foi testado junto com o óleo essencial de capim cidreira e hortelã. Esse aumento também foi verificado nos óleos de alecrim e hortelã para a tetraciclina.

Assim, o estudo indica possibilidade do uso de produtos naturais combinados aos antimicrobianos tradicionais, no intuito de aumentar o potencial antimicrobiano das drogas. Vale destacar também que mesmo os óleos que apresentaram um efeito antimicrobiano não tão eficiente como, por exemplo, os óleos essenciais de

Juliana A. A. Zago, Priscila I. Ushimaru, Lidiane N. Barbosa, Ary Fernandes Junior

capim cidreira, alecrim e hortelã, quando foram avaliados nos ensaios para determinação de sinergismo, estes foram para *S. aureus* os que apresentaram maior índice de sinergismo como, por exemplo, no caso do capim-cidreira que mostrou sinergismo com 100% das drogas testadas. Este mesmo fenômeno foi relatado com extrato de capim cidreira, que mesmo apresentando ação antimicrobiana fraca, foi o que apresentou maior índice de sinergismo com drogas antimicrobianas nos ensaios *in vitro* (Betoní et al., 2006).

Outro aspecto importante do estudo foi que a espécie do microrganismo avaliado interfere com os resultados, verificado pela baixa frequência de sinergismo dos óleos e drogas nos ensaios com as linhagens de *E. coli*. Isto reforça o fato que mais estudos *in vitro* são necessários visando estabelecer o perfil de sinergismo frente outras espécies bacterianas, pois se assim não for feito é possível a ocorrência de falhas quando for utilizada terapia combinatória no tratamento de doenças infecciosas. Ríos & Recio (2005) acrescentaram que os estudos de plantas medicinais como agentes antimicrobianos devem ser focados para a obtenção do maior número de informações específicas possíveis, como, por exemplo, os mecanismos de ações que possibilitam a sua ação antimicrobiana, bem como a toxicidade para células animais ou humanas, os efeitos *in vivo*, as possíveis interações positivas ou negativas com os antibióticos tradicionais, entre outras propriedades, além de padronização na metodologia visando possibilitar a reprodutibilidade nos ensaios biológicos. Também é fundamental que a composição do óleo essencial seja precisamente conhecida, pois, como relatado em diversos estudos, sua composição pode variar de acordo com diversos fatores, como o clima, solo, época e forma de plantio, adubação, condições ambientais, técnica de extração, além de variações genéticas intra-específicas da espécie vegetal, entre outros fatores que podem alterar o teor do princípio ativo presente no óleo (Nascimento et al., 2007).

Assim, é possível concluir que o *S. aureus* é mais suscetível às interações quando comparado com a *E. coli* e que o óleo essencial do capim-cidreira apresentou sinergismo com o maior número de drogas testadas. As drogas que mostraram maior índice de sinergismo com os vários óleos testados foram gentamicina, tetraciclina e ciprofloxacina, nos ensaios com *S. aureus* e cefepime nos ensaios com *E. coli*.

REFERÊNCIAS

Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agr Food Chem* 52: 3530-3535.

Betoní JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes

Junior A 2006. Synergism between plants extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 387-390.

Burt SA, Reinders RD 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36: 162-167.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 5. informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne (PA).

Denyer SP, Maillard JY 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol Symposium Supplement* 92: 35S-45S.

Lambert PA 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol Symposium Supplement* 92: 46S-54S.

Lima EO, Farias NMP, Souza EL, Santos BHC 2003. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. *Rev Bras Cienc Saude* 7: 251-258.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL 2006. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. *Rev Bras Farmacogn* 16: 197-201.

Lima MP, Zoghbi MGB, Andrade EHA, Silva TMD, Fernandes CS 2005. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amaz* 35: 363-366.

Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF 2002. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. *Quim Nova* 25: 429-438.

Matan N, Rinkeeree H, Mawson AJ, Chompreeda P, Haruthaithanasan V, Parker M 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol* 107: 180-185.

Nascimento GGF, Lucatelli J, Freitas PC, Silva GL 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 31: 247-256.

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AA, Santos PO, Barbosa Junior AM, Trindade R.C 2007. Antimicrobial activity of the essential oils: a multifactor approach of the methods. *Rev Bras Farmacogn* 17: 108-113.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2003. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6. ed. Wayne (PA): Approved Standard M7-A6.

Nguefack J, Budde BB, Jakobsen M 2004. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett Appl Microbiol* 39: 395-400.

Pereira RS, Sumita TC, Furlan MR, Jorge AOC, Ueno M 2004. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. *Rev Saude Publica*

- 38: 326-328.
- Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Souza EL, Toledo MS, Silva Filho RN 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn* 16: 77-82.
- Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Remmal A 2003. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Essent Oil Res* 15: 356-362.
- Rios JL, Recio MC 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100: 80-84.
- Santos AS, Alves SM, Figueiredo FJC, Rocha Neto OG 2004. Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. *Comunicado Técnico-Embrapa* 99: 1-6.
- Sabulal B, Dan M, J AJ, Kurup R, Pradeep NS, Valsamma RK, George V 2006. Caruophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmomi* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry* 67: 2469-2473.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Redher VLG 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 35: 275-280.
- Schelz ZMJ, Hohmann J 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77: 279-285.
- Silva, MTN, Ushimaru PI, Barbosa LN, Cunha MLRS, Fernandes Junior A 2009 Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. *Braz J Medicinal Plants* 11: 257-262.
- Silver LL, Bostian KA 1993. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Ch* 37: 377-383.

Anexo 5

SILVA N.C.C, **FERNANDES JÚNIOR A.** Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. ***Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease.*** v. 16, n. 03, p. 402-413, 2010.



Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity

Silva NCC (1), Fernandes Júnior A (1)

(1) Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Biosciences Institute, São Paulo State University (UNESP – Univ Estadual Paulista), Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Abstract: Plants have been used for thousands of years to flavor and conserve food, to treat health disorders and to prevent diseases including epidemics. The knowledge of their healing properties has been transmitted over the centuries within and among human communities. Active compounds produced during secondary vegetal metabolism are usually responsible for the biological properties of some plant species used throughout the globe for various purposes, including treatment of infectious diseases. Currently, data on the antimicrobial activity of numerous plants, so far considered empirical, have been scientifically confirmed, concomitantly with the increasing number of reports on pathogenic microorganisms resistant to antimicrobials. Products derived from plants may potentially control microbial growth in diverse situations and in the specific case of disease treatment, numerous studies have aimed to describe the chemical composition of these plant antimicrobials and the mechanisms involved in microbial growth inhibition, either separately or associated with conventional antimicrobials. Thus, in the present work, medicinal plants with emphasis on their antimicrobial properties are reviewed.

Key words: medicinal plants, phytochemistry, antimicrobial activity, plant extracts, essential oils, synergism.

INTRODUCTION

The use of plants for treating diseases is as old as the human species. Popular observations on the use and efficacy of medicinal plants significantly contribute to the disclosure of their therapeutic properties, so that they are frequently prescribed, even if their chemical constituents are not always completely known. All over the globe, especially in South American countries, the use of medicinal plants has significantly supported primary health care (1). From 250 to 500 thousand plant species are estimated to exist on the planet, and only between 1 and 10% are used as food by humans and other animals (2). Brazil has the world's highest biodiversity, accounting for over 20% of the total number of known species. This country presents the most diverse flora, with more than 55

thousand described species, which corresponds to 22% of the global total. Such biodiversity is followed by a wide acceptance of the medicinal plant use (3). Most of the Brazilian population (80%) consumes only 37% of the commercially available drugs and depend almost exclusively on medicines of natural origin (4). Thus, phytotherapies entered the market promising a shorter and cheaper production, since basic requirements to use medicinal plants do not involve strict quality control regarding safety and efficacy compared to the other types of drugs (5).

Infectious diseases represent an important cause of morbidity and mortality among the general population, particularly in developing countries. Therefore, pharmaceutical companies have been motivated to develop new antimicrobial drugs in recent years, especially due to the

constant emergence of microorganisms resistant to conventional antimicrobials. Apparently, bacterial species present the genetic ability to acquire and transmit resistance against currently available antibacterials since there are frequent reports on the isolation of bacteria that are known to be sensitive to routinely used drugs and became multiresistant to other medications available on the market (6, 7). Consequently, common strategies adopted by pharmaceutical companies to supply the market with new antimicrobial drugs include changing the molecular structure of the existing medicines in order to make them more efficient or recover the activity lost due to bacterial resistance mechanisms (8).

On the other hand, given the search for new antimicrobials, those of plant origin must be emphasized since Brazil possess such great biodiversity among which a large number of plants have been used for diverse purposes and tested throughout the globe for hundreds of years by different populations.

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF MEDICINAL PLANTS

The antimicrobial actions of "carqueja" (*Baccharis trimera* Less.) decoction on gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis*) and gram-negative (*Salmonella gallinarum* and *Escherichia coli*) bacterial strains were evaluated and it was found that the former microorganisms are more sensitive to this herb than the latter, which corroborates previous studies (9). Similarly, antimicrobial assays with plant extracts used in Asia (*Ruta graveolens* and *Zingiber officinale*) revealed an inhibitory capacity against *Bacillus cereus* strains (10).

In another study, the inhibitory activity of concentrates from 14 Brazilian plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains was analyzed (11). The substances that demonstrated inhibitory activity were ethanol extract and its fractions (n-hexane, water, chloroform, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol) from *Punica granatum* fruit (pomegranate) and parts of *T. avellaneda* wood (purple trumpet tree). The greatest activities were found in the ethyl acetate fraction from *P. granatum* and hexane and chloroform fractions from *T. avellaneda*.

As to the common yarrow (*Achillea*

millefolium), its essential oil (obtained from stem and leaves) presents higher antimicrobial activity than its respective extracts (methanol extract separated by chloroform into parts that were not all soluble). The oils prevented the growth of *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens* and *Candida albicans* and slightly inhibited *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* and *Candida krusei* (12).

A study evaluated the effects of some plant extracts (aqueous and 40% hydroalcoholic) against bacteria found in the oral cavity of dogs (13). It found that standard *S. aureus* strain and isolated *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis* strains were sensitive to extracts from garlic (*Allium sativum*), "espinheira santa" (*Maytenus ilicifolia*) and guava tree leaves (*Psidium guajava*).

Similarly, antibacterial properties against *Staphylococcus aureus* were found in chamomile. The phenolic compounds present in its ethanol extract are responsible for this activity (14). It was also reported that the aqueous extract from the artichoke (*Cynara scolymus*) and the ethanol extracts (80%) from both artichoke and "macela" (*Achyrocline satureioides*) inhibited the growth of *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *S. aureus* (14). In Argentina, terpene compounds (eugenol, geraniol, thymol and carvacrol) derived from essential oils of native plants showed inhibitory effects on MRSA (15).

In another work, essential oils from 28 plants were tested against ETEC (enterotoxigenic *E. coli*) and EPEC (enteropathogenic *E. coli*) serotypes, and the results indicated that palmarosa (*Cymbopogon martinii*), a highly common plant in Brazil, presents a wide spectrum of action against three ETEC and two EPEC serotypes, whereas Java citronella grass (*Cymbopogon winterianus*) inhibited one EPEC and two ETEC serotypes (16). The concentration responsible for the microbial inhibition varied between 100 and 500 µg/mL, while other plants caused inhibition only at higher concentrations.

Studies on the antimicrobial action of 70% methanolextracts from leaves of *Mikania glomerata* ("guaco"), *P. guajava* (guava), *Baccharis trimera* ("carqueja"), *Mentha piperita* (peppermint) and *Cymbopogon citratus* (lemongrass), and *A. sativum* (garlic), *Syzygium aromaticum* (clove) and *Zingiber officinale* (ginger) plants *in natura* were performed all showed some activity against

S. aureus, and the most effective extracts were those from clove at the concentration of 0.36 mg/mL and guava at 0.56 mg/mL (17).

In a study carried out in an indigenous community, it was reported that the hydroalcoholic extracts from *Vernonia polyanthes* ("assa-peixe"), *Aristolochia triangularis* ("cipó mil-homens"), *Tabebuia avellanedae* (purple trumpet tree) and *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") presented a significant antimycobacterial effect and that a local beverage, similar to rum (with an ethanol content of 30%), was employed to prepare the extracts (18).

Furthermore, the results of a recent study described a potent inhibitory activity of *Vernonia polyanthes* extract against *Leishmania* strains (19). However, its concentrate had no antifungal action under the same conditions. Similarly, *Baccharis dracunculifolia* oil ("alecrim-do-campo") at a 10- μ L dose prevented microbial growth of *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* in antimicrobial assays (20).

The essential oils from *Pelargonium graveolens* (geranium) present low values of minimum inhibitory concentration against *B. cereus* (0.36 mg/mL), *B. subtilis* (0.72 mg/mL) and *S. aureus* (0.72 mg/mL), whereas *Origanum vulgare* (oregano) oils also show antimicrobial activity against the same bacteria, in addition to *E. coli*; however, in the latter, a concentration of 0.35 mg/mL is required to inhibit *B. subtilis* whereas 0.70 mg/mL is necessary to inhibit the other bacteria (21).

In a recent study carried out at the Department of Microbiology and Immunology, Botucatu Biosciences Institute, UNESP, tests were performed utilizing extracts from *A. sativum* (bulbs), *Z. officinale* (rhizomes), *Caryophyllus aromaticus* (flower buds), *C. citratus* (leaves), *P. guajava* (leaves) and *M. glomerata* (leaves) against *Enterococcus* sp., *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella*. The extracts from garlic (*A. sativum*) and ginger (*Z. officinale*) presented the most intense activity against gram-negative bacteria; for garlic, concentrations ranged from 1.38 to 1.61 mg/mL while for ginger it was 6.97. Gram-positive strains were more susceptible to guava extracts at concentrations between 0.77 and 1.74 mg/mL, and to clove extracts at concentrations from 0.46 to 1.24 mg/mL (22).

Costa *et al.* (23) tested the inhibitory capacity of essential oils from *Croton zehntneri* (wild

cinnamon) leaves against *Shigella flexneri*, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *S. aureus* and *Streptococcus* β -hemolyticus strains and found antimicrobial activity against all bacteria, except *Salmonella*. Moreover, the inhibitory action against *S. flexneri* was highly significant, with a minimal inhibitory concentration of 25 μ g/mL (23).

Remarkable results using the disc methodology were established in tests on the leaf, phloem and latex of *Croton urucurana* ("urucurana") against the bacteria *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium and *S. flexneri* (24). It was found that latex inhibited all tested bacteria except *E. coli* and showed strong activity against *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (0.125 to 1 mg/disc), whereas leaf hexane extract presented the widest spectrum against gram-negative bacteria and strong action against *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* (0.25 mg/disc). The dichloromethane extract was active only against *S. pyogenes* (0.5 mg/disc), whereas hydroalcoholic extract acted against gram-positive bacteria and revealed a potent action against *Salmonella* Typhimurium (0.5 to 1 mg/disc). On the other hand, the ethyl acetate extract was inactive. As to phloem, the hexane and dichloromethane extracts were active against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* at concentrations from 0.5 to 1 mg/disc; chloroform extract was the most potent against *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* and *K. pneumoniae*, at concentrations ranging from 0.25 to 1 mg/disc, but was ineffective against *S. flexneri* and *Salmonella* Typhimurium. Furthermore, ethyl acetate extract presented an antimicrobial effect only against *K. pneumoniae* and *S. epidermidis*, whereas 75% ethanol extract had a wide activity against *E. faecalis*, *S. pyogenes* and *P. aeruginosa* strains; for both extracts the concentration on the disc was between 0.25 and 1 mg.

More *et al.* (25), studying extracts from eight South African plants frequently used against human oral cavity pathogens (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Candida albicans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Streptococcus mutans*), found that six of the eight plants (*Annona senegalensis*, *Englerophytum magalimontanum*, *Dicerocarym senecioides*, *Euclea divinorum*, *Euclea natalensis*, *Solanum*

panduriforme and *Parinari curatellifolia*) had antimicrobial effect against those microorganisms, of which gram-negative ones were more resistant (25).

In another work, the antimicrobial activities of hexane, chloroform, acetone, ethanol, methanol and aqueous extracts from roots and leaves of bushy lippia (*Lippia alba*) at the concentration of 2 mg/disc were evaluated against *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium smegmatis*, *Monilia sitophila* and *C. albicans* (26). The results indicated that chloroform, acetone and ethanol extracts from roots prevented the growth of *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *C. albicans* and *M. sitophila*, while hexane, ethanol and methanol extracts from leaves inhibited *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* and *M. sitophila*.

The ethanol extract from *Hyptis martiusii* suppressed the growth of *E. coli* and MRSA strains (at concentrations between 128 and 512 µg/mL) and was more effective when compared with gentamicin and methicillin (27). Likewise, the ethanol extract and essential oil from *Myrtus communis* (myrtle) presented antibacterial effect against *B. subtilis* and *S. aureus*, but not against *E. coli* (28). Extracts from the peel of *Punica granatum* fruit (pomegranate) were inhibitory against 38 *S. aureus* strains (29).

Rosmarinus officinalis Linn. (rosemary) hydroalcoholic extract was assayed against *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* standard strains, and its antimicrobial activity was proven in all tests, except against *S. mitis* (30).

Although there are numerous previous studies on medicinal uses of natural products, their application as food additive has only been reported in recent years. Thus, assays with *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella* Enteritidis strains isolated from food and essential oils from leaves of oregano, thyme, basil, marjoram, lemongrass, ginger rhizomes and clove flower buds were performed (31). These bacterial strains were susceptible to the oils, among which lemongrass was the most effective against gram-positive microorganisms, followed by clove and ginger; the concentrations (%v/v) were respectively 0.05, 0.09 and 0.09. In addition, thyme and clove were the most effective against

gram-negative bacteria at the concentration of 0.10%v/v. The potential use of these essential oils from aromatic plants to conserve meat and meat derivatives deserves further research.

The hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol extracts from phloem of *Bowdichia virgilioides* ("sucupira"), *Calophyllum brasiliense* (guanandi), *Cariniana rubra* ("jequitibá"), *Lafoensia pacari* ("dedaleira") and *Stryphnodendron obovatum*; *Simaba ferruginea* rhizomes; and *C. urucurana* latex were tested against several bacteria and fungi (32). Ethyl acetate and hexane extracts from *C. brasiliense* phloem showed marked antibacterial activity against gram-positive bacteria such as *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. agalactiae*. Ethyl acetate and ethanol extracts from *L. pacari* phloem and *B. virgilioides* extracts produced some effects on fungi. Silva Jr. *et al.* (32) claimed that it was the first report on antifungal activities of extracts from *C. rubra* and *S. ferruginea*.

The antibacterial activity of essential oils from oregano (*Origanum vulgare*) against multiresistant bacteria – including *E. coli*, *E. faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and MRSA – was analyzed by Costa *et al.* (33). Concentrations of at least 0.125% showed higher antimicrobial efficiency on the studied bacterial strains, although *P. aeruginosa* was found to be more resistant to the essential oil because it was only inhibited at the concentration of 0.5% (33).

Zampini *et al.* (34) examined multiresistant bacteria under the influence of ethanol extracts from 11 Argentinean plant species (*Baccharis boliviensis*, *Chilotrichiopsis keidelii*, *Chuquiraga atacamensis*, *Fabiana bryoides*, *Fabiana densa*, *Fabiana punensis*, *Frankenia triandra*, *Parastrephia lucida*, *Parastrephia lepidophylla*, *Parastrephia phylliciformis*, and *Tetraglochin cristatum*). They observed growth inhibition in at least one of the following tested strains: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* and *P. aeruginosa* (34).

In another study, essential oils from rosemary (*R. officinalis*), clove (*Caryophyllus aromaticus* L.), ginger (*Z. officinalis*), lemongrass (*C. citratus*), peppermint (*M. piperita*) and cinnamon (*Cinnamomum zeilanicum* Blume) were tested against *S. aureus* and *E. coli* strains. The oils showed some antimicrobial action; ginger

essential oil was the most efficient against *S. aureus* while cinnamon and clove were the most effective against *E. coli* at 0.09%v/v (35). Additionally, the cyclohexane extract of *Monodora myristica* fruit and the ethyl acetate extract from the stem bark of *Albizia gummifera* were effective in inhibiting *C. albicans* and *Candida krusei* (36).

As in previous studies, the antimicrobial activity of essential oils from oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Thymus vulgaris*), marjoram (*Origanum majorana*) and basil (*Ocimum basilicum*) was evaluated in meat products against strains of *L. monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis (37). It was reported that all oils showed antibacterial activity and that, particularly, gram-positive bacteria were more susceptible to them.

Based on the aforementioned data, it is possible to conclude that the literature on testing antimicrobial activity of plant products is broad, including an increasing number of publications per year. Therefore, it is difficult to integrate all those numerous studies on the antimicrobial action of plant products into the present review; a multidisciplinary approach to this theme is increasingly required.

INTERACTION BETWEEN NATURAL PRODUCTS AND ANTIMICROBIAL DRUGS

In addition to the antimicrobial action of plant extracts and essential oils, a synergism between conventional antimicrobial drugs and products obtained from medicinal plants has also been reported. Possible interactions among medications are frequently observed, which has motivated researchers to test such possibilities. However, it must be emphasized that interactions between synthetic and natural drugs depend on several factors including pharmacokinetics and employed doses, since combinations confirmed *in vitro* may not have the same effect on humans (38). Nevertheless, innumerable studies on this particular theme can be found in the literature.

Synergism assays between terpenes and penicillin against MRSA and *E. coli* revealed a synergistic effect produced by the combination of carvone and penicillin whereas an antagonistic effect between thymol and penicillin was detected against MRSA strains. Regarding *E. coli*, synergism was present among penicillin, eugenol and thymol; however, terpene and myrcene only revealed an antagonistic effect (15).

The synergistic effect between plant extracts – clove, jambul (*Syzygium cumini*), pomegranate and thyme – and some antimicrobial drugs was also evaluated. Garlic extract, when combined with ampicillin, revealed some effects on *Klebsiella pneumoniae* whereas *Proteus* sp. growth was inhibited by an association between clove extract and tetracycline. These extracts presented antimicrobial activity, even against microorganisms resistant to antibiotics, thus acting either separately or in association with antibiotics used in conventional therapy (6).

In another study on the interactions between natural products and drugs, synergism was discovered between pairs involving one of eight plant extracts and one of 13 antimicrobial drugs. Furthermore, synergism was also detected in at least two drugs with ginger and 11 drugs with lemongrass and clove when tested against *S. aureus* strains (17). On the other hand, synergism was not observed when this type of study was carried out using *E. coli* strains; instead, antagonistic reactions were detected (39).

Essential oils from *Conyza bonariensis* (horseweed), *Lippia sidoides* (rosemary-pepper), *Plectranthus amboinicus* (mint) and *Eucalyptus citriodora* (eucalyptus) were studied by Oliveira *et al.* (40), who aimed to verify synergism of ampicillin, cephalothin, chloramphenicol, gentamicin and tetracycline against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* and *E. coli* strains. Ampicillin, cephalothin and tetracycline presented synergistic interactions with the oils whereas gentamicin mostly had antagonistic interactions. Some of the synergisms detected in the study were with *L. sidoides* oil, which improved the antimicrobial effect of ampicillin and cephalothin against *S. aureus* and *S. epidermidis*; while *C. bonariensis* had synergistic action with ampicillin, cephalothin, chloramphenicol and tetracycline against *S. epidermidis*; and *P. amboinicus*, associated with ampicillin and cephalothin had synergistic action when tested against *S. aureus* and *S. epidermidis*.

Synergism was also detected in *in vitro* assays testing interactions between *Pelargonium graveolens* oil and norfloxacin against *S. aureus* and *B. cereus*, confirming the capacity of that oil to increase the antimicrobial activity of this antibiotic (21).

Fungi have also been evaluated for synergism between natural products and antifungals.

There were reports of synergism between ketoconazole and *Agastache rugosa* essential oil against *Blastischizomyces capitatus* and between *Pelargonium graveolens* essential oil and amphotericin B plus ketoconazole on strains of *Aspergillus* sp. (41, 42).

Synergism using different concentrations of commercial oils derived from *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *M. piperita* and *R. officinalis* with ciprofloxacin against *S. aureus* and *K. pneumonia*, and with amphotericin B against *C. albicans* strains was observed while *R. officinalis* had a predominantly antagonistic profile in combination with the tested drugs against *S. aureus* and *C. albicans* strains (43). Synergism was also verified against *K. pneumoniae* while *M. alternifolia* had a higher level of antagonism than synergism. *T. vulgaris* presented antagonism against all studied pathogens, and *M. piperita* revealed synergism against *S. aureus* and antagonism against *C. albicans*. Regarding *K. pneumonia*, the results indicated antagonism or synergism according to the concentration assayed.

Probst (44) reported the antimicrobial action of clove (*C. aromaticus*), ginger (*Z. officinale*), peppermint (*M. piperita*) and cinnamon (*C. zeylanicum*) essential oils against *S. aureus* and *E. coli*. Moreover, the interactions of these plants with ethanol extracts of propolis, ginger and mint were synergistic when tested against *S. aureus* whereas against *E. coli* only cloves showed synergism (44).

Synergism between the essentials oils of cinnamon (*C. zeylanicum*), lemon grass (*C.*

citratus), peppermint (*M. piperita*), ginger (*Z. officinale*), clove (*C. aromaticus*) and rosemary (*R. officinalis*) and eight antimicrobial drugs (chloramphenicol, gentamicin, cefepime, tetracycline, sulfazotrim, cephalothin, ciprofloxacin and rifampicin) was tested by the Kirby and Bauer method against strains of *S. aureus* and *E. coli*. The highest rates of synergism were between lemon grass and the eight drugs tested followed by mint and seven drugs (except cefepime against *S. aureus*). Against *E. coli*, only rosemary associated with three drugs and lemon grass with two antimicrobials revealed synergism (45).

The interaction of Surinam cherry (*Eugenia uniflora*), "alecrim-do-campo" (*Baccharis dracunculifolia*), "assa-peixe" (*V. polyanthes*) and chamomile (*M. chamomilla*) with conventional antimicrobial drugs against strains of *S. aureus* was reported and the results are presented in Table 1 (46). In the same study, their interactions against *E. coli* were not relevant, since they presented only three cases of synergism and five of antagonism.

Thus, studies on the interactions between natural products and antimicrobial drugs have also multiplied in recent years, indicating the importance of elucidating those types of interactions, which can be either favorable, such as in synergism, or harmful, as in antagonism. However, such associations, even if beneficial, will not necessarily be used in therapy against infectious diseases, since further studies are still required, especially *in vivo* studies and research on the toxicity of these products to humans.

Table 1. Results of synergism between plant extracts or essential oils with antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* strains

Drugs	"Alecrim-do-campo"		"Assa-peixe"		Chamomile		Surinam cherry	
	Oil	Extracts	Oil	Extracts	Oil	Extracts	Oil	Extracts
Cephalothin	S	I	S	I	I	I	I	I
Gentamicin	S	I	S	I	I	I	S	I
Tetracycline	S	I	S	I	I	S	I	I
Sulfazotrim	S	I	S	I	S	I	S	I
Ciprofloxacin	S	I	S	I	S	I	S	I
Cefepime	S	I	S	I	I	I	I	I
Chloramphenicol	S	I	S	I	I	I	I	I
Rifampicin	S	I	S	I	S	S	I	I

Synergism was considered positive when $p < 0.05$; S: synergism; I – indifferent.

Source: Silva (46).

ANTIMICROBIAL ACTIVITY MECHANISMS OF NATURAL PRODUCTS

Most plants contain several compounds with antimicrobial properties for protection against aggressor agents, especially microorganisms. The chemical structures of some antimicrobial compounds, according to Cowan (2), obtained from plants are shown in Figure 1.

Active compounds found in some plants have antiseptic action; for example, thyme has thymol and carvacrol, clove has eugenol and isoeugenol, and oregano has carvacrol and terpinenol-4. In some cases, terpenes from essences that are soluble in water have higher antibacterial power than others (47).

The sites or structures of the bacterial cell that are considered targets for action by the components of natural products are illustrated

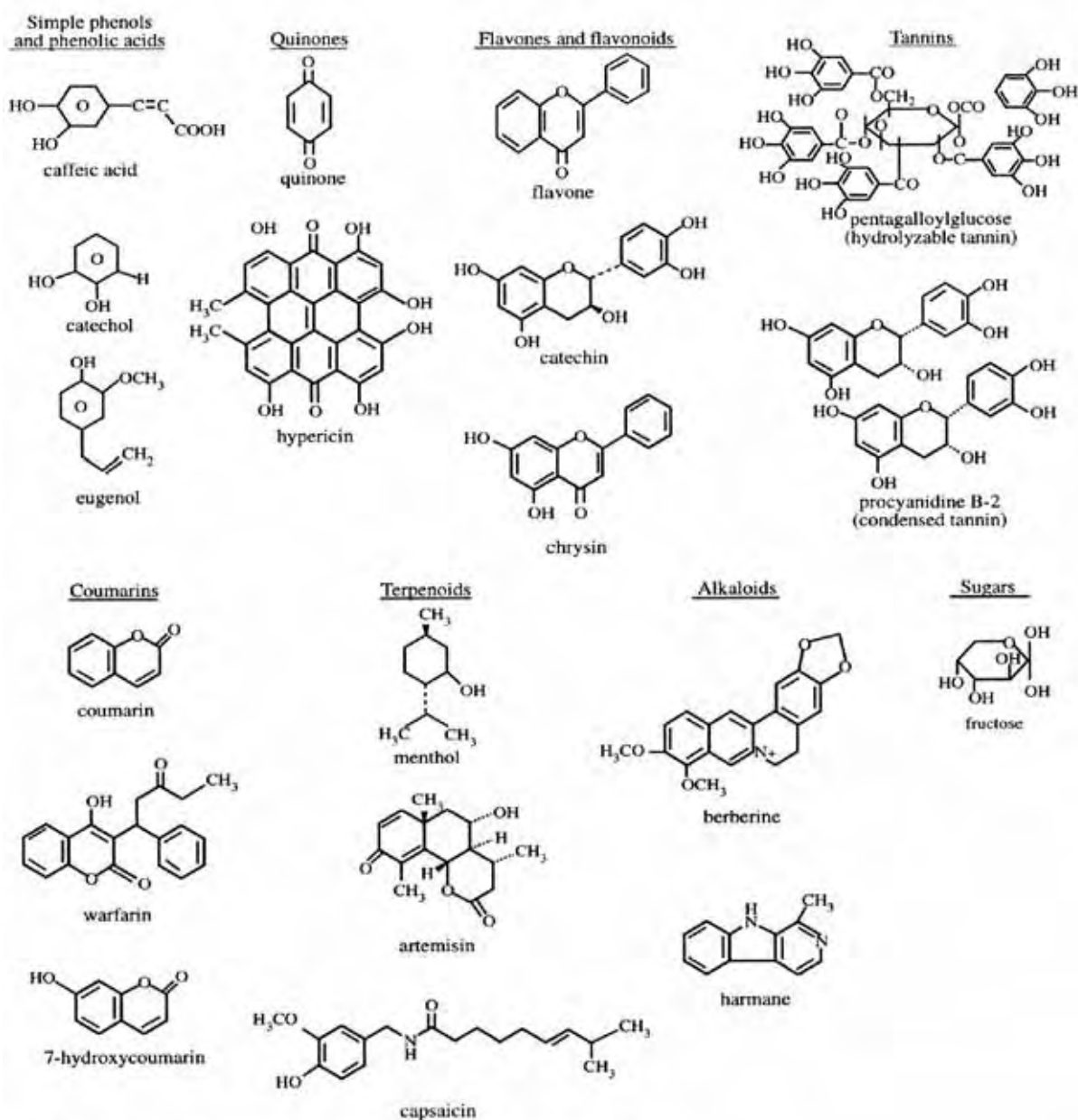


Figure 1. Chemical structures of antimicrobial compounds (2).

in Figure 2. The action mechanisms of natural compounds are related to disintegration of cytoplasmic membrane, destabilization of the proton motive force (PMF), electron flow, active transport and coagulation of the cell content. Not all action mechanisms work on specific targets, and some sites may be affected due to other mechanisms (48).

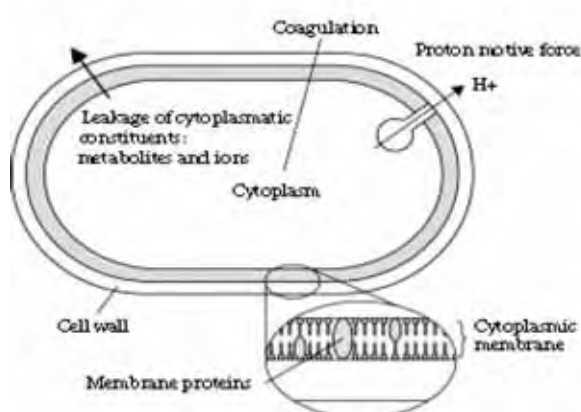


Figure 2. Sites in a bacterium where natural compounds are active (48).

Important characteristics responsible for the antimicrobial action of essential oils include hydrophobic components that allow the participation of lipids from the bacterial cell membrane, which disturbs cell structures and make them more permeable (49).

Chemical compounds from essential oils also act on cytoplasmic membrane proteins (47). Cyclic hydrocarbons act on ATPases, enzymes known to be located at the cytoplasmic membrane and surrounded by lipid molecules. In addition, lipid hydrocarbons may distort the lipid-protein interaction, and the direct interaction of lipophilic compounds with hydrophobic parts of the protein is also possible (50). Some essential oils stimulate the growth of pseudo-mycelia, evidencing that they may act on enzymes involved in the synthesis of bacterium structural components (51).

Several compounds and their mechanisms of action on microorganisms are listed below.

Carvacrol and thymol

The structure of thymol is similar to that of carvacrol; however, they differ as to the location of the hydroxyl group in the phenolic ring. Both substances seem to make the membrane

permeable (52). Their structure disintegrates the external membrane of gram-negative bacteria, releasing lipopolysaccharides (LPS) and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane to ATP. The presence of magnesium chloride does not influence this action, suggesting a chelating mechanism of different cations on the external membrane (53).

Eugenol

Different concentrations of eugenol may inhibit the production of amylase and protease by *B. cereus*. Furthermore, cell wall degradation and cell lysis were also reported (54).

p-Cymene

A precursor of carvacrol, this hydrophobic compound provokes greater swelling of the cytoplasmic membrane compared to carvacrol (55).

Carvone

When tested at concentrations higher than its minimum inhibitory concentration, carvone dissipates gradient pH and cell membrane potential. The growth of *E. coli*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* may decrease according to the concentrations of carvone, suggesting that it acts by disturbing the general metabolic status of the cell (56).

Cinnamaldehyde

Cinnamaldehyde is known to inhibit *E. coli* and *Salmonella Typhimurium* growth at concentrations similar to those of carvacrol and thymol. However, it neither disintegrates the outer membrane nor weakens the intracellular ATP (53). Its carbonyl group has affinity for proteins, preventing the action of decarboxylase amino acids on *E. aerogenes* (57).

Lastly, Table 2 includes the main action mechanisms of plant antimicrobials according to the groups already mentioned.

FINAL REMARKS

Since ancient times, plants have been used by several communities to treat a large number of diseases, including infections. Numerous studies on the pharmacology of medicinal plants have been accomplished, since they

constitute a potential source for the production of new medicines and may enhance the effects of conventional antimicrobials, which will probably decrease costs and improve the treatment quality. However, several plants may present antagonistic effects during antibiotic therapy.

An important aspect comprises the search for new compounds that have antimicrobial action and synergism with currently available antimicrobial drugs, since bacteria resistant to conventional medicines are increasingly frequent; consequently, medicinal plants constitute an alternative for infection treatment.

The antimicrobial activity of plants was

proven by various examples, in the form of both essential oils and extracts. Thus, this property can be a promising ally in the development of medicines necessary to combat the increasing number of bacterial strains that become resistant to conventional antibiotics.

Therefore, given that the literature on tests for the antimicrobial action of plant products is broad, including an increasing number of publications per year, it is highly difficult to relate the countless reports on the antimicrobial action of these products in this review article about a subject of such a great complexity, which requires a multidisciplinary approach.

Table 2. Main groups of plant compounds with antimicrobial activity

Class	Subclass	Examples	Mechanism
Phenolics	Simple phenols	Catechol	Substrate deprivation
		Epicatechin	Membrane disruption
	Phenolic acid	Cinnamic acid	?
	Quinones	Hypericin	Adhesin binding, complex with cell wall, enzyme inactivation
	Flavonoids	Chrysin	Adhesin binding
		-	Complex with cell wall
	Flavones	Abyssinone	Enzyme inactivation
			HIV reverse transcriptase inhibition
	Flavonols	Totarol	?
	Tannins	Ellagitannin	Protein binding
			Adhesin binding
Enzyme inhibition			
Substrate deprivation			
Complex with cell wall			
Membrane disruption			
Coumarins	Warfarin	Metal-ion complexation	
		Interaction with eucaryotic DNA (antiviral activity)	
Terpenoids, essential oils	-	Capsaicin	Membrane disruption
Alkaloids	-	Berberine	Intercalation into cell wall and/or DNA
		Piperine	
Lectins and polypeptides	-	Mannose-specific agglutinin	Block of viral fusion or adsorption
		Falxatin	Disulfide bridge formation
Polyacetylenes	-	8s-heptadeca-2(Z),9(Z)-diene-4,6-diyne-1,8-diol	?

Source: adapted from Cowan (2).

COPYRIGHT

© CEVAP 2010

SUBMISSION STATUS

Received: May 18, 2010.

Accepted: May 21, 2010.

Abstract published online: June 7, 2010.

Full paper published online: August 31, 2010.

CONFLICTS OF INTEREST

There is no conflict.

CORRESPONDENCE TO

ARY FERNANDES JUNIOR, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu, SP, 18618-970, Brasil. Phone: +55 14 3811 6058. Email: ary@ibb.unesp.br.

REFERENCES

1. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Grynberg NF, Echevarria A. Medicinal plants: the need for multidisciplinary scientific studies. *Quim Nova*. 2002;25(3):429-38.
2. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4):564-82.
3. Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Shuqair NSMSAQ, Machado Netto E. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*. 2007;5(11):26-32.
4. Funari CS, Ferro VO. Ethical use of the Brazilian biodiversity: necessity and opportunity. *Rev Bras Farmacogn*. 2005;15(2):178-82.
5. Niero R. Fármacos, fitofármacos e fitoterápicos: abordagem econômica e de mercado. In: Bresolin TMB, Cechinel Filho V, editors. *Fármacos e medicamentos. Uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Editora Santos; 2010. p. 1-15.
6. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol*. 2000;31(1):247-56.
7. Sakagami Y, Kajimura K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. *J Hosp Infec*. 2002;50(2):140-4.
8. Chartone-Souza E. Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida. *Cienc Hoje*. 1998;23(138):27-35.
9. Avancini CAM, Wiest JM, Mundstock EA. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less.) D.C. Compositae decocto, as disinfectant or antiseptic. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2000;52(3):230-4.
10. Alzoreky NS, Nakahara K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol*. 2003;80(3):223-30.
11. Machado TB, Pinto AV, Pinto MC, Leal ICR, Silva MG, Amaral ACE, et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21(3):279-84.
12. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol*. 2003;87(2-3):215-20.
13. Menezes MC, Souza MMS, Botelho RP. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of Brazilian plants extracts on bacteria isolated from oral cavity of dogs. *Rev Univ Rural*. 2004;24(2):141-4.
14. Asolini FC, Tedesco AM, Ferraz C, Alencar SM, Carpes ST. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds in extracts of plants used as tea. *Braz J Food Technol*. 2006;9(6):209-15.
15. Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygadlo J, Demo M. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Mol Med Chem*. 2006;10(1):30-2.
16. Duarte MCT, Delarmelina C, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VLG. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against EPEC and ETEC *Escherichia coli*. *Rev Bras PI Med*. 2006;8(n.esp.):139-43.
17. Betoni JE, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes Jr A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):387-90.
18. Oliveira DG, Prince KA, Higuchi CT, Santos ACB, Lopes LMX, Simões MJS, et al. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *J Basic Appl Pharm Sci*. 2007;28(2):165-9.
19. Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, Matos MO, Moreira FO, Scio E, et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007;111(2):396-402.
20. Ferronato R, Marchesan ED, Pezenti E, Bednarski F, Onofre SB. Antimicrobial activity of essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Rev Bras Pharmacogn*. 2007;17(2):224-30.
21. Rosato A, Vitali C, Laurentis N, Armenise D, Milillo MA. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine*. 2007;14(11):727-32.
22. Ushimaru PI, Silva MTN, Di Stasi LC, Barbosa L,

- Fernandes Jr A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. *Braz J Microbiol.* 2007;38(1):717-9.
23. Costa JGM, Rodrigues FFG, Angélico EC, Pereira CKB, Souza EO, Caldas GFR, et al. Chemical composition and evaluation of the antibacterial activity and toxicity of the essential oil of *Croton zehntneri* (variety estragol). *Rev Bras Pharmacogn.* 2008; 18(4):583-6.
 24. Oliveira IS, Lima JCS, Silva RM, Martins DTO. *In vitro* screening of antibacterial activity of the latex and extracts from *Croton urucurana* Baillon. *Rev Bras Pharmacogn.* 2008;18(4):587-93.
 25. More GK, Tshikalange TE, Lall N, Botha FS, Meyer JJM. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *J Ethnopharmacol.* 2008;119(1):473-7.
 26. Aguiar JS, Costa MCCC, Nascimento SC, Sena KXFR. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Rev Bras Pharmacogn.* 2008; 18(3):436-40.
 27. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA strains. *Rev Bras Pharmacogn.* 2008;18(Supl.):670-5.
 28. Salvagnini LE, Oliveira JRS, Santos LE, Moreira RRD, Pietro RCLR. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) leaves. *Rev Bras Pharmacogn.* 2008;18(2):241-4.
 29. Silva MAR, Higino JS, Pereira JV, Siqueira-Júnior JP, Pereira MSV. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. *Rev Bras Pharmacogn.* 2008;18(2):209-12.
 30. Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. *In vitro* antimicrobial activity and antiadherence of *Rosmarinus officinalis* Linn. against oral planktonic bacteria. *Rev Bras Pharmacogn.* 2008;18(2):236-40.
 31. Barbosa LN, Rall VL, Fernandes AA, Ushimaru PI, da Silva Probst I, Fernandes A Jr. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6(6):725-8.
 32. Silva Jr. IE, Cechinel Filho V, Zacchino SA, Lima JCS, Martins DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev Bras Pharmacogn.* 2009;19(1B):242-8.
 33. Costa AC, Santos BHC, Santos Filho L, Lima EO. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. *Rev Bras Pharmacogn.* 2009;19(1B):236-41.
 34. Zampini IC, Cuello S, Alberto MR, Ordonez RM, D'Almeida R, Solorzano E, et al. Antimicrobial activity of selected plant species from "the Argentine Puna" against sensitive and multiresistant bacteria. *J Ethnopharmacol.* 2009;124(3):499-505.
 35. Silva MTN, Ushimaru PI, Barbosa LN, Cunha MLRS, Fernandes Jr A. Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. *Rev Bras PI Med.* 2009; 11(3):257-62.
 36. Mboosso EJ, Ngouela S, Nguedia JC, Beng VP, Rohmer M, Tsamo E. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. *J Ethnopharmacol.* 2010;128(2):476-81.
 37. Barbosa LN. Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservantes em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação [thesis]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2010. 107 p.
 38. Szalek E, Grzeskowiak E, Kozielczyk J. Interactions between herbal and synthetic drugs. Advantages and risks. *Herba Polonica.* 2006;52(4):153-7.
 39. Ushimaru PI. Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas [thesis]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2007. 51 p.
 40. Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, et al. Study of the interference of essential oils on the activity of some antibiotic used clinically. *Rev Bras Pharmacogn.* 2006;16(1):77-82.
 41. Shin S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. *Arch Pharm Res.* 2003;26(5):389-93.
 42. Shin S, Kang CA. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(2):111-5.
 43. van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48(4):440-6.
 44. Probst I. Ação antibacteriana de extrato etanólico de própolis e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo entre estes produtos naturais. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2009. 41 p.
 45. Zago JAA, Ushimaru PI, Barbosa LN, Fernandes Jr A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections.

- Rev Bras Pharmacogn. 2009;19(4):828-33.
46. Silva NCC. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas [thesis]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2010. 67 p.
47. Knobloch K, Pauli A, Iberl B. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res.* 1989;1(3):119-28.
48. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):233-53.
49. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem.* 1994;269(11):8022-8.
50. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 1995;59(2):201-22.
51. Conner DE, Beuchat LR. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J Food Sci.* 1984;49(2):429-34.
52. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol.* 2001;91(3):453-62.
53. Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ, et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem.* 1998;46(9):3590-5.
54. Thoroski J, Blank G, Biliaderis C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *J Food Prot.* 1989;52(6):399-403.
55. Ultee A, Bennink MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(4):1561-8.
56. Oosterhaven K, Poolman B, Smid EJ. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Ind Crops Prod.* 1995;4(1):23-31.
57. Wendakoon CN, Sakaguchi M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of enterobacter aerogenes by active components in spices. *J Food Prot.* 1995; 58(3):280-3.

Anexo 6

SILVA, N.C.C.; BARBOSA, L.N.; SEITO, L.N.; **FERNANDES JÚNIOR, A.** Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural Product Research*, v. xx, p.xxx, 2012 (Disponível on line).

.

SHORT COMMUNICATION

Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants

N.C.C. Silva^a, L. Barbosa^b, L.N. Seito^c and A. Fernandes Junior^{a*}

^aDepartment of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil; ^bDepartment of Biostatistics, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil; ^cDepartment of Pharmacology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

(Received 1 July 2010; final version received 16 February 2011)

We aimed to establish a phytochemical analysis of the crude extracts and performed GC-MS of the essential oils (EOs) of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) and Asteraceae species *Baccharis dracunculifolia* DC, *Matricaria chamomilla* L. and *Vernonia polyanthes* Less, as well as determining their antimicrobial activity. Establishment of the minimal inhibitory concentrations of the crude extracts and EOs against 16 *Staphylococcus aureus* and 16 *Escherichia coli* strains from human specimens was carried out using the dilution method in Mueller–Hinton agar. Some phenolic compounds with antimicrobial properties were established, and all EOs had a higher antimicrobial activity than the extracts. *Matricaria chamomilla* extract and *E. uniflora* EO were efficient against *S. aureus* strains, while *E. uniflora* and *V. polyanthes* extracts and *V. polyanthes* EO showed the best antimicrobial activity against *E. coli* strains. *Staphylococcus aureus* strains were more susceptible to the tested plant products than *E. coli*, but all natural products promoted antimicrobial growth inhibition.

Keywords: plant crude extracts; essential oils; medicinal plants; minimal inhibitory concentration; antibacterial activity; phytochemical analysis

1. Introduction

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) is used as anti-diarrhoeal, diuretic, anti-rheumatic, anti-febrile and anti-diabetic agents in Brazilian folk medicine and its leaf extracts possess anti-inflammatory (Schapoval, Silveira, Miranda, Alice, & Henriques, 1994) and antimicrobial activities (Oliveira, Lopes, Cabral, & Eberlin, 2006).

Terpenoids and flavonoids are the chemical groups most commonly found in the genus *Baccharis* (Asteraceae) (Verdi, Brighente, & Pizzolatti, 2005) and *Baccharis dracunculifolia* DC also has phenolic compounds (Funari, Ferro, & Mathor, 2007) with antimicrobial activity (Duarte, Figueira, Pereira, Magalhães, & Delarmelina, 2004; Ferronato, Marchesan, Pezenti, Bednarski, & Onofre, 2007).

*Corresponding author. Email: ary@ibb.unesp.br

2 N.C.C. Silva et al.

Vernonia polyanthes Less (Asteraceae) are used in folk medicine in Brazil against flu, colds, coughs, bronchitis, bruises, haemorrhoids and infections of the uterus (Corrêa, Bertolucci, Pinto, Reis, & Alves, 2004), showing antibacterial activity against mycobacterial strains (Oliveira et al., 2007).

Matricaria chamomilla L (Asteraceae) is used as tea against gastrointestinal and nervous diseases (Fragoso, Esparza, Burchiel, Ruiz, & Torres, 2008) as well as antimicrobial activities (Romero et al., 2005).

We aimed to establish the antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude methanolic extracts and essential oils (EOs) from *E. uniflora*, *B. dracunculifolia*, *V. polyanthes* and *M. chamomilla* samples against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens.

2. Results and discussion

Extracts' dry weight, EO density and yield, phytochemical analysis of extracts and EO are presented in Table 1. Phenols, flavonoids and fixed strong acids were found in all extracts, which were previously reported for their antimicrobial activity (Burt, 2004). Most compounds identified in the oils were monoterpenes or sesquiterpenes, which may be involved in the EO antimicrobial effect (Cowan, 1999), although other compounds may also have increased their antimicrobial effects, in a synergistic way. The crude extracts showed around 10% of those obtained in the EO samples and were used for processing the minimum inhibitory concentration (MIC) values (mg mL^{-1}) in the antibacterial assays.

MIC_{90%} values are presented in Table 2, and found that *S. aureus* strains were susceptible to both extracts and EOs from all studied plants. The crude extracts from *M. chamomilla*, followed by *V. polyanthes* and *B. dracunculifolia*, were those with the highest activities against *S. aureus* strains, while in contrast, the EO from *E. uniflora* showed the highest inhibitory activity against this bacterium, with a value of MIC_{90%} 2.2 mg mL^{-1} . On the other hand, *E. coli* strains were less susceptible to plant products, except to *E. uniflora* extract, which MIC_{90%} (2.2 mg. ml^{-1}) showed the best inhibitory effect, although all EOs showed a similar result. Therefore, all plants showed an antimicrobial activity, either as extracts or oils, revealing their potential use as antimicrobial agents.

Gonçalves, Alves Filho, and Menezes (2005) verified the antimicrobial activity of hydroalcoholic extract of *E. uniflora* against *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus coagulase-negative*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp and *Shigella sonnei*. These data corroborate our results since *E. uniflora* had a potential as an antimicrobial agent among the assayed plants. Auricchio and Bacchi (2003) demonstrated the presence of flavonoids and tannins in *E. uniflora* crude extract, allowing us to conclude that these compounds are characteristic of this plant species, although further studies should characterise flavonoid and tannin groups.

Terpenoids and flavonoids (Verdi et al., 2005) and phenolic compounds (Funari et al., 2007) were found in the genus *Baccharis*. Ferronato et al. (2007) found that *B. dracunculifolia* EO showed antimicrobial effect against *E. coli*, *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, while our results showed higher MIC values assaying *S. aureus* and *E. coli* strains. Duarte et al. (2004) reported that the MIC for *B. dracunculifolia* extract against *Enterococcus faecium* strains was 10-fold higher for

Table 1. Physico-chemical characterisation of plant (crude extracts and EOs) antimicrobials.

Vegetal source	Density (mg mL ⁻¹) (EOs)	Dry weight (mg mL ⁻¹) (crude extracts)	Yield (%) (EOs)	Phytochemical analysis of crude extracts	GC-MS of EOs
<i>E. uniflora</i>	924.0	145.0	0.19	Phenols, tannins, chalcones, aurones, flavones, catechins, flavonoids, saponins, fixed strong acids, quaternary compounds, free steroids and quinones	Selina 1,3,7(11) trien-8-one (30.1%), Selina 1,3,7(11) trien-8-one-epoxide (21.89%), β cariofilene (6.51%)
<i>V. polyanthes</i>	856.0	62.5	0.15	Phenols, tannins, chalcones, aurones, flavonoids, fixed strong acids, saponins, free steroids, quinones and flavananois	Germacrene D (27.79%), ϵ -Cariofilene (16.2%), Germacrene B (15.01%)
<i>B. dracunculifolia</i>	857.0	76.0	0.20	Phenols, tannins, flavones, catechins, flavonoids, saponins, fixed strong acids, quaternary bases and xanthonnes	Nerolidol (18.77%), Germacrene D (10.45%), limonene (8.75%)
<i>M. chamomilla</i>	940.0	100.0	0.17	Phenols, flavones, flavonoids, fixed strong acids, quaternary compounds, quinones, xanthonnes, free triterpenes	Chamazulene (31.48%) α -bisabolol and Bisabolone oxide (15.71%)

Note: GC-MS – Gas chromatography-mass spectrometry.

the Gram-positive bacteria, although different bacterial strains were studied. The differences between the MICs may be due to the chemical composition and edaphoclimatic conditions (harvest season, time, location, among others), changing secondary compounds (Gobbo-Neto and Lopes, 2007). Souza, Sena, Maranhão, Oliveira, and Guimarães (2008) found compounds such as fixed acids, alkaloids, coumarins, flavonic and saponin glycosides and the presence of alkaloids, coumarins

4 N.C.C. Silva et al.

Table 2. Minimal inhibitory concentration (mg mL^{-1}) values for 90% ($\text{MIC}_{90\%}$) of *S. aureus* and *E. coli* strains according to the crude extracts and EOs.

Vegetal source	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Crude extracts	Essential oils	Crude extracts	Essential oils
<i>B. dracunculifolia</i>	5.4 ^a	3.7 ^{ac}	32.4 ^{ab}	25.8 ^a
<i>V. polyanthes</i>	3.3 ^{ab}	2.8 ^a	26.9 ^{ac}	24.1 ^a
<i>M. chamomilla</i>	1.2 ^b	2.9 ^{bc}	43.4 ^b	28.2 ^b
<i>E. uniflora</i>	24.1 ^c	2.2 ^b	15.9 ^c	27.6 ^c

Note: Different letters in columns represent significant differences in antimicrobial activity between products when $p \leq 0.05$.

and flavonoids in *V. polyanthes* samples. Oliveira et al. (2007) reported the anti-mycobacterial activity with *V. polyanthes*, crude extracts as well as viable count of inhibited cells after 3 h of contact in the time kill curve assay. Despite different methodologies performed, our results were also satisfactory with *V. polyanthes* crude extract.

Matricaria chamomilla showed antibacterial activity against *S. aureus* and phenolic compounds were responsible for its antimicrobial properties (Romero et al., 2005). Nogueira, Diniz, and Lima (2008) found no inhibition against *P. aeruginosa* growth with chamomile EO, but 4% EO inhibited *S. aureus* and *Candida albicans* strains, with inhibition zones ranging between 10 and 12 mm. Thus, *M. chamomilla* extract and EO showed important inhibitory action against *S. aureus* strains, and phenolic compounds were found in the phytochemical analysis. However, we believe that other compounds are involved with the antimicrobial property together with the phenols.

3. Conclusion

The results showed the potential use of these plants as antimicrobial agents and *S. aureus* strains were more susceptible to plant products than *E. coli* and all natural products promoted antimicrobial growth inhibition. Further studies should investigate the toxicity and chemical characterisation, aiming its use in the treatment of infectious diseases, either alone or as an adjuvant with conventional antimicrobial drugs.

Supplementary material

Experimental details relating to this article are available online.

Acknowledgements

The authors thank Dr Margarida Saeki and Dr Julio Doyama for the chromatographic analysis of essential oils, and Dr José Mauricio Sforcin for the critical review of the manuscript.

Anexo 7

FENIMAN, C.M.; RALL, V.L.M.; DOYAMA, J.T.; **FERNANDES JÚNIOR**
A. Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil. Natural Product Research, v. xx, n. xx, p. xx-xx, 2012 (Disponível on line).

.

SHORT COMMUNICATION

Cell enumeration and visualisation by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil

C.M. Feniman^{a*}, V.L.M. Rall^b, J.T. Doyama^c and A. Fernandes Júnior^b

^aDepartment of Technology, Regional Campus of Umuarama, State University of Maringá, Umuarama-PR, Brazil; ^bDepartment of Microbiology and Immunology, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu-SP, Brazil; ^cDepartment of Chemistry and Biochemistry, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu-SP, Brazil

(Received 1 February 2011; final version received 15 May 2011)

The use of essential oils (EOs) in functional foods containing probiotic microorganisms must consider the antimicrobial activity of these oils against beneficial bacteria such as *Lactobacillus rhamnosus*. This study aimed to evaluate the sensitivity of *L. rhamnosus* cultures treated with cinnamon EO through viable cell counts and visualisation by transmission electron microscopy. Cinnamon EO at a concentration of 0.04% had a bacteriostatic activity after 2 h of incubation. Although slight alterations were detected in the cell structure, this concentration was considered to be bactericidal, since it led to a significant reduction in cell numbers after 24 h. On the other hand, cinnamon EO at a 1.00% concentration decreased cell counts by 3 log units after 2 h incubation and no viable cell count was detected after 24 h. Transmission electron microscopy indicated that cells treated with 1.00% cinnamon EO were severely damaged and presented cell membrane disruption and cytoplasmic leakage.

Keywords: essential oils; probiotic foods; *Lactobacillus rhamnosus*

1. Introduction

Essential oils (EOs) are complex volatile compounds characterized by a strong flavour. They are formed as secondary metabolites in aromatic plants and are known for their antiseptic, bactericidal, fungicidal, antiviral and medicinal properties (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008).

EOs have also been used in foods and they have been employed as flavourings and natural preservatives. Cinnamon EO has shown antimicrobial actions against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with minimum inhibitory concentrations for 90% samples (MIC_{90%}) equal to 0.047% and 0.09% (v/v), respectively (Silva, Ushimaru, Barbosa, Cunha, & Fernandes Júnior, 2009).

However, the application of EOs in functional foods must consider any undesirable antimicrobial effects against probiotic bacteria. In order to have beneficial effects, probiotic bacteria must be viable and at high concentrations of at least 10⁶ CFU g⁻¹ product (Szymański et al., 2006).

*Corresponding author. Email: crisfeniman@yahoo.com.br

2 C.M. Feniman et al.

The main microorganisms that are considered to be probiotic are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, which can be incorporated into foods alone or combined (Shah, 2007). Several functional properties are associated with *L. rhamnosus*.

The beneficial effects of *L. rhamnosus* emphasize the importance of maintaining the cell integrity of this bacterium in functional products of interest when considering the application of EOs as preservatives. Thus, the aim of this study was to investigate the sensitivity of *L. rhamnosus* cultures treated with cinnamon EO based on viable cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy.

2. Results and discussion

Cinnamon EO presented a density of 1.0049 g mL^{-1} and its chemical composition, obtained by gas chromatography–mass spectrometry, showed that 89.58% of the compounds were identifiable: cinnamaldehyde was the major component (67.58%), followed by cinnamyl acetate (6.49%). Prabuseenivasan, Jayakumar, and Ignacimuthu (2006) found 52.4% cinnamaldehyde in cinnamon EO, while S.-T. Chang, Chen, and S.-C. Chang (2001) detected 76% cinnamaldehyde in the EO extracted from cinnamon leaves.

Cell counts were performed at 0, 2 and 24 h after contact between the EO and *L. rhamnosus* cultures. Initially, the control culture had a lower viable cell count than the treatments with 0.04% and 1.00% cinnamon EO. After 2 h, there was an increase in the control cell count of around 3 log units, whereas the treatment with 0.04% cinnamon EO remained almost stable and the treatment with 1.00% cinnamon EO showed a decrease of 3 log units.

After 24 h, the control culture showed a decrease in the cell count, which was close to the value obtained at 0 h. The treatment with 0.04% cinnamon EO led to a significant decrease of 5 log units relative to times 0 and 2 h. Although the cinnamon EO only had a bacteriostatic action after 2 h of contact, it was bactericidal at the concentration corresponding to the MIC after 24 h, demonstrating that the length of contact between the bacterium and the EO is a factor for the effectiveness of the antimicrobial activity of the EO, as stated by Moreira, Ponce, Del Valle, and Roura (2005).

Regarding the treatment with 1.00% cinnamon EO, no colony formation was observed on the plates sown with this dilution and with 0.1 mL of the culture itself after 24 h of incubation, and the cell count was considered as being lower than 10 CFU mL^{-1} . This concentration of the EO was reported by Burt (2004) as being necessary for an antimicrobial action in complex food systems. However, these findings are negative for the use of EOs in probiotic foods, since bactericidal action against *L. rhamnosus* is undesirable.

In this study, the structure of *L. rhamnosus* cells treated with 0.04% cinnamon EO showed a certain loss of cell wall uniformity and small areas of cytoplasmic leakage when observed by transmission electron microscopy. More severe alterations were observed in cells treated with 1.00% cinnamon EO. Important areas of cytoplasmic membrane disruption were detected, especially in the polar regions. Consequently, cytoplasmic leakage occurred, as observed by Rasooli, Rezae, and Allameh (2006) in *Listeria monocytogenes* cells treated with thyme EO at 125 ppm.

Areas that were most likely to have increased membrane permeability were observed around the cells, including in nearby outer clusters of cell components, as observed by Moosavy et al. (2008) in *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* cells treated with $3 \mu\text{L mL}^{-1}$ of EO of *Zataria multiflora* B., a typical plant in Iran.

References

- Auricchio, M.T., & Bacchi, E.M. (2003). *Eugenia uniflora* L. "brazilian cherry" leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. *Adolfo Lutz Institute Journal*, 62, 55–61.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Corrêa, R.M., Bertolucci, S.K.V., Pinto, J.E.B.P., Reis, E.S., & Alves, T.L. (2004). The essential oil yield and organoleptic leaves characteristics of assa-peixe under various dry methods. *Ciência e Agrotecnologia*, 28, 339–344.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
- Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Pereira, B., Magalhães, P.M., & Delarmelina, C. (2004). Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 14, 6–8.
- Ferronato, R., Marchesan, E.D., Pezenti, E., Bednarski, F., & Onofre, S.B. (2007). Antimicrobial activity of essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 224–230.
- Fragoso, L.R., Esparza, J.R., Burchiel, S.W., Ruiz, D.H., & Torres, E. (2008). Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227, 125–135.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., & Mathor, M.B. (2007). Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 206–212.
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N.P. (2007). Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, 30, 374–381.
- Gonçalves, A.L., Alves Filho, A., & Menezes, H. (2005). Comparative study on antimicrobial activity of some native tree extracts. *Arquivos do Instituto de Biologia*, 72, 353–358.
- Nogueira, J.C.R., Diniz, M.F.M., & Lima, E.O. (2008). In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 74, 118–124.
- Oliveira, A.L., Lopes, R.B., Cabral, F.A., & Eberlin, M.N. (2006). Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, 99, 1–5.
- Oliveira, D.G., Prince, K.A., Higuchi, C.T., Santos, A.C.B., Lopes, L.M.X., Simões, M.J.S., & Leite, C.Q.F. (2007). Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 28, 165–169.
- Romero, C.D., Chopin, S.F., Buck, G., Martinez, E., Garcia, M., & Bixby, L. (2005). Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 253–257.
- Schapoal, E.E.S., Silveira, S.M., Miranda, M.L., Alice, C.B., & Henriques, A.T. (1994). Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 44, 137–142.
- Souza, F.A., Sena, J., Maranhão, L.T., Oliveira, C.M.R., & Guimarães, A.T.B. (2008). *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) and *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae) aerial parts infusions: preliminary phytochemical study. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 89, 24–27.
- Verdi, L.G., Brighente, I.M.C., & Pizzolatti, M.G. (2005). The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. *Química Nova*, 28, 85–94.

3. Conclusions

Cinnamon EO had antimicrobial activity on *L. rhamnosus* cultures, causing decreased numbers of viable cells both at the concentration relative to the MIC value and at the concentration required to have an effect when applied in foods. The 1.00% concentration had damaging effects, i.e. a loss of cell wall uniformity with probable cytoplasmic membrane disruption and cell leakage. Because *L. rhamnosus* is a probiotic bacteria, these *in vitro* effects are undesirable in the case of cinnamon EO being used as a preservative in functional foods containing *L. rhamnosus*.

Supplementary material

Experimental details relating to this article are available online, alongside Table S1 and Figures S1 and S2.

References

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 446–475.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*, 223–253.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F., & Chang, S.-C. (2001). Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, *77*, 123–127.
- Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misahi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A.E., . . . , Noori, N. (2008). Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, *41*, 1050–1057.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Del Valle, C.E., & Roura, S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, *38*, 565–570.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *6*, 39.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, *10*, 236–241.
- Silva, M.T.N., Ushimaru, P.I., Barbosa, L.N., Cunha, M.L.R.S., & Fernandes Júnior, A. (2009). Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, *11*, 257–262.
- Shah, N.P. (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, *17*, 1262–1277.
- Szymański, H., Chmielarczyk, A., Strus, M., Pejcz, J., Jawien, M., Kochan, P., & Heczko, P.B. (2006). Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. *Digestive and Liver Disease*, *38*, S274–S276.

Table S1. Viable cell count for *L. rhamnosus* cultures treated with cinnamon essential oil (EO) after a period of contact with the EO.

Time (h)	Description	Log units
0	Control	8.67 ^d ± 0.33
	Treated with 0.04% EO	9.38 ^{bc} ± 0.16
	Treated with 1.00% EO	9.84 ^b ± 0.06
2	Control	11.48 ^a ± 0.28
	Treated with 0.04% EO	9.27 ^c ± 0.09
	Treated with 1.00% EO	6.88 ^e ± 0.06
24	Control	9.29 ^c ± 0.21
	Treated with 0.04% EO	4.32 ^f ± 0.09
	Treated with 1.00% EO	<1.00 ^g ± 0.00

Note: The same letters in the same column indicate statistically equal medians ($p < 0.05$).

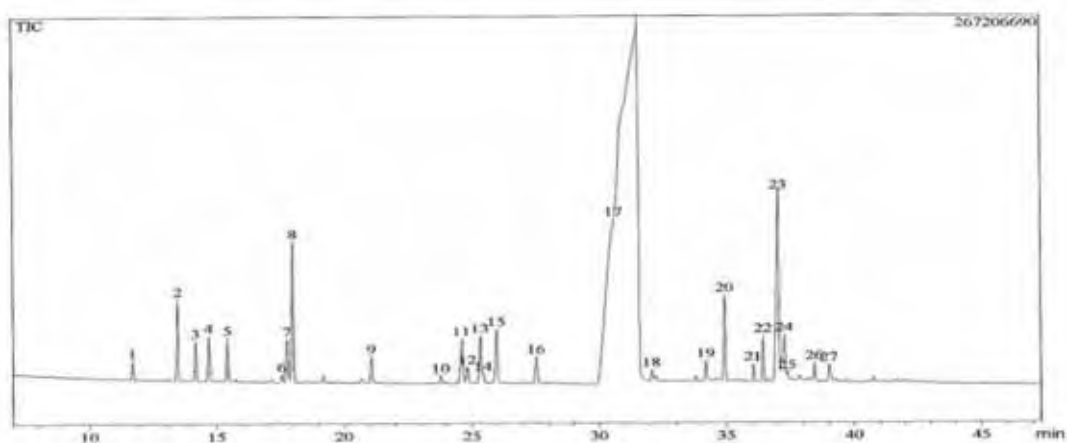


Figure S1. The GC-MS chromatogram obtained for cinnamon EO that was used to identify its compounds; 88.59% of the compounds were identified. Peak 2: α -pinene (1.62%); 3: camphene (0.79%); 5: β -pinene (0.93%); 6: cymene (0.17%); 7: limonene (1.11%); 8: cineol (3.31%); 9: linalool (0.55%); 12: borneol (0.50%); 13: terpinen-4-ol (1.22%); 15: α -terpinene (1.43%); 17: cinnamaldehyde (67.58%); 19: eugenol (1.82%); 22: caryophyllene (0.88%); 23: cinnamyl acetate (6.49%); 25: α -humulene (0.19%).

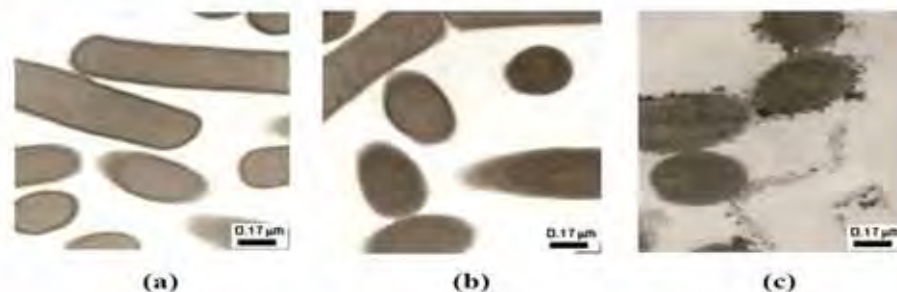


Figure S2. *Lactobacillus rhamnosus* cells photographed by electron microscopy, 11500 \times magnification: (a) control, (b) treated with 0.04% cinnamon EO, (c) treated with 1.00% cinnamon EO.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conforme relatado por VIEGAS JÚNIOR & BOLZANI (2006), o conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos, e também os indígenas, é considerado um fator fundamental para descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. Assim, a convivência, e aprendizado, com os diferentes grupos étnicos foram importantes para o desenvolvimento da pesquisa com produtos naturais e conhecimento das relações íntimas entre estrutura química do e suas propriedades biológicas e inter-relações animais/insetos/planta.

A literatura sobre propriedades biológicas dos produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, é bastante ampla conforme foi possível notar, mas sabemos também que este tipo de pesquisa tem muito ainda que avançar e descobertas ainda ocorrerão em função do desenvolvimento tecnológico que certamente permitirá o melhor entendimento sobre a química dos compostos naturais e mecanismos envolvidos com as respectivas propriedades biológicas. Além disto, o planejamento de estudos farmacológicos com plantas na forma de chás e extratos exige investigações minuciosas em face dos inúmeros fatores que dificultam a comprovação em modelos animais e humanos já os produtos naturais normalmente são misturas complexas de princípios ativos, e outros secundários, que variaram quanto sua composição e podem apresentar interações tanto sinérgicas como antagônicas.

Quanto aos estudos futuros tenho a humildade e consciência que nesta linha de pesquisa, embora traga no seu bojo quase que uma visão romântica sobre ciência e a vontade imensurável de encontrar na natureza um composto com o potencial de revolucionar a terapêutica das doenças infecciosas, existe um caminho longo ainda por seguir, especialmente quanto ao meu aprimoramento como pesquisador e por ter também a consciência que não basta verificar apenas a ação antimicrobiana *in vitro* quando se pretende chegar a um produto com possibilidade de uso irrestrito pela população. Acredito também serem fundamentais as parcerias para realização dos ensaios *in vivo* e em culturas de células.

Neste sentido, e pelo fato de pertencer a uma instituição tão dinâmica e competente como o Instituto de Biociências de Botucatu que apresenta no seu quadro pesquisadores de competência inquestionável, acredito que estas parcerias serão fundamentais para que eu possa obter um avanço significativo em minhas pesquisas. A título de exemplo, atualmente oriento um projeto de doutorado na área de óleos essenciais, cujas parcerias são fundamentais, pois envolve experimentação em animais, na área de Bioquímica e em culturas de células, na área de Imunologia. Também tem se revelado indispensável as parcerias com colegas da área de Farmacologia e Química, que por realizarem as caracterizações químicas dos derivados vegetais, tem facilitado as publicações das nossas pesquisas em periódicos da área.

Para finalizar, e mais importante que definir no momento os projetos ainda por serem realizados em nosso Laboratório, acredito que com a consolidação de parcerias poderemos aprofundar as pesquisas para o desvendamento dos mistérios da natureza e dos seus compostos com potencial de benefícios à humanidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS

- ALMEIDA, R.B.A.; CARRETTO, C. F.P.; SANTANA, R.S.; FURLAN, M.R.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf sobre *Candida* spp. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.37, p. 147-153, 2008
- AL-REZA, S.M.; RAHMAN, A.; JONGHWI LEE, J.; KANG, S.C. Potential roles of essential oil and organic extracts of *Zizyphus jujuba* in inhibiting food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 119, n. 3, p. 981-986, 2010.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem; leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4364-4370, 2006.
- ARQUES, J. L.; RODRIGUEZ, E.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Inactivation of gramnegative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisinor the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, v. 227, p. 77–82, 2008.
- BAGAMBOULA, C.F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, v. 21, p. 33-42, 2004.
- BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; GUNNESS, T.K.; SOOKAR, D.; BHOYROO, S.; JUGESSUR, R.; REEBYE, D.; GOOGOLYE K.; CROZIER, A.; ARUOMA, O.I. Black tea reduces uric acid and C-reactive protein levels in humans susceptible to cardiovascular diseases. *Toxicology*, v. 278, p. 68-74, 2010.

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; ZHIRI, A.; IDAOMAR, M. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, v. 585, p.1-13, 2005.
- BAPELA, N.B.; LALL, N.; FOURIE, P.B.; FRANZBLAU, S.G.; VAN RENSBURG, C.R. Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytomedicine*, v. 13, p. 630–35, 2006
- BARBOSA, L. N.; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; USHIMARU, P. I.; PROBST, I. S.; FERNANDES JÚNIOR, A. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 6, p.725-728, 2009.
- BARBOSA, L.N. Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação. 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- BASTOS, D.H.M.; ISHIMOTO, E.Y.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F.; TORRES, E.A.F.S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 538-543, 2006.
- BENDAHO, M.; MUSELLI, A.; GRIGNON-DUBOIS, M.; BENYOUCEF, M.; DESJOBERT, J.M.; BERNARDINI, A.F.; COSTA, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, v. 106, p. 132-139, 2008.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, v. 37, p. 263-268, 2004.

- BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 387-390, 2006.
- BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, v. 85, p. 415-421, 2004.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BURT, S. A.; DER ZEE, R. V.; KOETS, A. P.; DE GRAAFF, A. M.; VAN KNAPEN, F.; GAASTRA, W.; et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p. 4484–4490, 2007.
- BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, A. R. M.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 610-616, 2007.
- BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*, v. 25, p. 207-211, 2008.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Biological Research*, v.33, p. 179-189, 2000.

- CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.S.A. Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, v.5, p.26-32, 2007.
- CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V.; OZEK, T.; BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, v.100, p.553–559, 2007.
- CHENG, S-S.; LIU, J-Y.; CHANG, E-H.; CHANG, S-T. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5145-5149, 2008.
- COS, P., VLIETINCK, A.J.; Dirk VAN DEN BERGHE, D.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, v.19, p.290-302, 2006.
- CRAGG, C.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation*, v.17, p.153-163, 1999.
- CUTTER, C. N. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, v. 65, p. 601-607, 2000.
- DAVIDSON, P.M. Food antimicrobial: back to nature. *Acta Hort. (ISHS)* 709, p. 29-34, 2006. http://www.actahort.org/books/709/709_3.htm.
- DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *Revista Multiciência*, Campinas, 7, 2006.
- DUDAREVA, N., FLORENCE NEGRE, F., NAGEGOWDA, D.A., ORLOVA, I. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 25, p. 417-440, 2006.

- EL-MASSRY, K. F.; EL-GHORAB, A.H.; SHAABAN, H.A.; SHIBAMOTO, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 57, p. 5265-5270, 2009.
- FENIMAN, C.M. Potencialização de óleos essenciais como antimicrobianos aplicados em produtos lácteos fermentados. 2011. 97 f. Tese (Doutorado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- FENIMAN, C.M.; RALL, V.L.M.; DOYAMA, J.T.; FERNANDES JÚNIOR A. Cell enumeration and visualization by transmission electron microscopy of *Lactobacillus rhamnosus* treated with cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* B.) essential oil. *Natural Product Research*, v. xx, n. xx, p. xx-xx, 2012 (Disponível on line).
- FERNANDES JÚNIOR, A.; BALESTRIN, E.C.; BETONI, J.E.C.; ORSI, R.O.; CUNHA, M.L.R.S.; MONTELLI, A.C. Própolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 563-566, 2005.
- FONSECA, P.; LIBRANDI, A.P.L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, p. 271-277, 2008
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science & Technology*, v. 19, p.156-164, 2008.
- FOGLIO, M.A.; QUEIROGA. C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Revista Multiciência*, 7, 2006.

- GOBBO-NETTO, L.; LOPES, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*, v. 30, p.374-381, 2007.
- GONI, P.; LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; GOMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERIN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, v.116, p. 982-989, 2009.
- GONZÁLEZ, L.S., VARGAS,M., MARTINEZ, C.G., CHIRALT, A., CHÁFER, M. Use of essential oils in bioactive edible coatings, *Food Engineering Reviews*,. v.3, p. 1-16, 2011.
- GOVARIS**, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P.S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 137, p.175-180, 2010.
- GUTIERREZ, J.; BOURKE, P.; LONCHAMP, J.; BARRY-RYAN, C. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.10, p.195-202, 2009.
- HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETMANN, K. Search for new drugs of plant origin. *Advances in Drug Research*, v.20, p.167-169, 1991.
- HAO, Y.Y.; BRACKET, R.E.; DOYLE, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *Journal of Food Protection*, v.61, p.307-312, 1998.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*,v.15, p. 639–652, 2008.
- KALEMBA, K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, v.10, p. 813–829, 2003.

- KUMAR, A.S.; VENKATESHWARAN, K.; VANITH, J.; SARAVANAN, V.S.; GANESH, M.; VASUDEVAN, M.; SIVAKUMAR, T. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v.4, p.13-6, 2009.
- LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; PATRIGNANI, F.; BELLETTI, N.; GUERZONI, M. E.; GARDINI, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Food Science & Technology*, v. 15, p. 201-208, 2004.
- MACHADO, B.F.M.T. Óleos essenciais: Verificação da ação antimicrobiana *in vitro*, na água e sobre a microbiota da pele humana. 2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- MACHADO, B.F.M.T., FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Acadêmicos (UNISUL)*, v. 03, p. 105-127, 2011.
- MAIER, T.; SCHIEBER, A.; KAMMERER, D.R.; CARLE, R. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chemistry*, v.112, p.551-559, 2009.
- MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, v.104, p.1258-1268, 2007.
- MARINO, M., BERSANI, C. and COMI, G. Impedance measurement to study antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int J Food Microbiol*, v.67, p.187-195, 2001.
- MARTOS, M. V., NAVAJAS, Y.R., ZAPATA, E.S., LÓPEZ, J.F., ÁLVAREZ, J.A.P. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragrance Journal*. v. 25, p.13–19, 2010.

- MARZOUG, H.N.B.; ROMDHANE, M.; LEBRIHI, A.; MATHIEU, F.; COUDERC, F.; ABDERRABA, M.; KHOUJA, M.L.; BOUAJILA, J. *Eucalyptus oleosa* essential oils: chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules*, v.16, p. 1695-1709, 2011.
- MENDONZA-YEPES, M.J.; SANCHEZ-HIDALGO, L.E.; MAERTENS, G.; MARINIESTA, F. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*, v. 17, p.47-55, 1997.
- MISAGHI, A., BASTI, A.A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. *Food Control*. V.18, p.1043-1049, 2007.
- MOOSAVY, M.H.; BASTI, A.A.; MISAHI, A.; SALEHI, T.Z.; ABBASIFAR, R.; MOUSAVI, H.A.E.; ALIPOUR, M.; RAZAVI, N.E.; GANDOMI, H.; NOORI, N. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International*, v.41, p.1050-1057, 2008.
- MONTANARI, C.A. Química medicinal: Contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. *Química Nova*, v. 18, p. 56-64, 1995.
- MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT – Food Science and Technology*, v. 38, p. 565-570, 2005.
- MUNÓZ, M.; GUEVARA, L.; PALOP, A.; TABERA, J.; FERNÁNDEZ, P.S. Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *LWT – Food Science and Technology*, v. 42, p. 220-227, 2009.

- NAIDU, A.S. *Natural Food Antimicrobial Systems*. Boca Ranton: CRC Press, 2000.
- NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.A.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p. 108-113, 2007.
- NYCHAS, G.J.E.; TASSOU, S.C.; BOARD, R.G. Phenolic extract from olives: inhibition of *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 10, p. 217-220, 1990.
- OKEKE, R. LAXMANINARAYAN, Z.A. BHUTTA, A.G. DUSE, P. JENKINS, T.F. O'BRIEN, A. PABLOS-MENDEZ AND K.P. KLUGMAN, Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. *Lancet Infectious Diseases*, v.5, p. 481-493, 2005.
- OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.P.; BEGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, v.37, p.155-162, 1997.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 18, p.414-420, 2007.
- POL, IE; KROMMER, J.; SMID, EJ. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. *Innovative Food Science & Emerging*, 3, p.55-6, 2002
- PROBST, I.S.; SFORCIN, J.M.; RALL, V.L.M.; FERNANDES, A.A.H.; FERNANDES JÚNIOR A. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism

between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Disease*, v. 17, p.159-167, 2011.

PROBST, I.S. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C. Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Química Nova*, v.30, p.1446-1455, 2007

RECIO, M.C.; RÍOS, J.L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978–88. *Phytotherapy Research*, v. 3, p.117-125, 1989.

REINBTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.J. Regeneration of plants from somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Journal of Plant Physiology*, v.137, p.224-228, 1990.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 23,p. 127-149, 1988.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p. 80-84, 2005.

RODOLFO, M.G. Estudo da atividade antibacteriana de produtos naturais. 1996. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas- Modalidade Médica)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, v. 91, p. 621-632, 2005.

- SACHIN, B.S.; SHARMA, S.C.; SETHI, S.; TASDUQ, S.A.; TIKOO, M.K.; TIKOO, A.K.; SATTI, N.K.; GUPTA, B.D.; SURI, K.A.; JOHRI, R.K.; QAZI, G.N. Herbal modulation of drug bioavailability: enhancement of rifampicin levels in plasma by herbal products and a flavonoid glycoside derived from *Cuminum cyminum*. *Phytotherapy Research*, v.21, p.157–63, 2007.
- SILVA, M.C.; CARVALHO, J.C.T. Plantas Medicinais: In: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2004, 480 p.
- SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JÚNIOR, A. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.11, p. 257-262, 2009.
- SILVA, N.C.C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. 2010, 67 f, Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- SILVA, N.C.C.; FERNANDES JÚNIOR, A. biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v.16, p.402-413, 2010.
- SILVA, N.C.C.; BARBOSA, L.N.; SEITO, L.N.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural Product Research*, v. xx, p.xxx, 2012 (Disponível on line).
- SILVA, G.S. Atividade antibacteriana de plantas do cerrado da região de Botucatu-São Paulo. 2010. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em

Ciências Biológicas-Modalidade Bacharelado)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010..

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2001.

STEFANINI, M.B.; FIGUEIREDO, R.O.; MING, L.C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antimicrobial activity of the essential oils of some spice herbs. *Acta Horticulturae.*, 597, 215-216, 2003

VAN VUUREN, S.F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A.M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letter Applied Microbiology*, v. 48, p.440-446, 2009.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 326-377, 2006.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants: safe cure? *Química Nova*, v. 28, p.519-528, 2005.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, v. 21, p.1199-1218, 2010.

TAN, M., ZHOU, L.; QUIN, M.; LI, D.; JIANG, W.; WANG, Y.; HAO, X. Chemical composition and antimicrobial activity of the flower oil of *Russowia sogdiana* (Bunge) B. Fedtsch. (Asteraceae) from China. *The Journal of Essential Oil Research*, v. 19, p.197-200, 2007.

TASSOU, C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. *Journal of Applied Bacteriology*, v.78, p.593-600,1995.

- TASSOU, C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G.J.E. Inhibition of *Salmonella* enteritidis and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. *Food Research International*, v. 33, n. 3-4, p. 273-280, 2000.
- USHIMARU, P.I.; SILVA, M.T.N.; DI STASI, L.C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.717-719, 2007.
- USHIMARU, P.I. Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. 2007. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas-Modalidade Médica)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES, A.A.H.; DI STASI, L.C.; FERNANDES JÚNIOR, A. *In vitro* antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. *Natural Product Research*, v. xx, p, xx-xx, 2012 (Disponível on line)
- ZAGO, J.A.A.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; FERNANDES JÚNIOR, A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.19, p. 828-833, 2009.
- WANNES, W.A.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M.B.; OLFA OUCHIKH, O.; HAMDAOUI, G.; KCHOUK, M.E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 1362-1370, 2010.