

CONTROLE MICROBIOLÓGICO DOS EFEITOS *IN VIVO* DE DUAS APRESENTAÇÕES DA PRÓPOLIS EM FERIDAS CONTAMINADAS DE CÃES

Results of *in vivo* and microbiological control of two formulas of propolis used in contaminated wounds of dogs

Iandara Silveira¹, Alceu Gaspar Raiser²

RESUMO

Foram utilizados 10 cães, sem raça definida, de porte pequeno, divididos em dois grupos de cinco. Os animais do grupo I foram submetidos a quatro feridas experimentais localizadas no dorso, medindo 2cm x 2cm com separação de 3cm entre si. Cada ferida recebeu um tratamento: com tintura de própolis, pomada formulada com a mesma tintura, álcool e uma delas sem tratamento, como controle. Foram coletados swabs, para cultura e contagem de colônias. As feridas foram contaminadas pela flora do ambiente, deixadas abertas durante 48 horas, quando foi coletada a primeira amostra. O segundo swab foi coletado no quarto dia de tratamento. A observação dos resultados foi subjetiva quanto a cicatrização (através da observação de tecido de granulação e diminuição da contaminação da ferida) e através da cultura e contagem de colônias de cada amostra, colhida de cada ferida. Nos animais do grupo II, testemunhas do experimento, foram feitas feridas e coletadas amostras nos mesmos padrões do grupo I, porém sem tratamento. Foi observada diminuição das colônias e

presença de tecido de granulação em todas as feridas do grupo I, no quarto dia de tratamento. No grupo II não houve diminuição das colônias e as feridas apresentavam grande quantidade de pus sob as crostas. Considera-se assim que a própolis é eficiente como alternativa antibiótica em feridas contaminadas de cães.

Palavras-chave: própolis, ferida, cão.

SUMMARY

Ten small dogs of mixed races were studied in two groups in order to evaluate the effect of propolis on superficial wounds. Four wounds of 2cm x 2cm were made in the skin and subcutaneous tissue of the dorsal region in each dog. The wounds were separated by 3cm from each other. In group I each wound received a different treatment including respectively: propolis extract, propolis extract and vaseline, alcohol and no treatment. The five subjects of group II form a control group. It was concluded that infected wounds of the skin and subcutaneous tissue may be treated successfully with propolis.

1. Médica Veterinária, Aluna do Curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de cirurgia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). 97119-900 - Santa Maria - RS.

2. Médico Veterinário, Orientador, Professor Titular, do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM.

Key words: wound, propolis, dog.

INTRODUÇÃO

A própolis não possui uma definição científica completa, mas sabe-se que é uma cera originada de uma resina colhida das árvores pelas abelhas colhedoras, que a transporta para a colméia, onde é remastigada e enriquecida com enzimas. Possui diversas substâncias antibióticas naturais, propriedades bacteriostáticas e bactericidas com uma ação antimicrobiana de espetacular eficiência, sem qualquer efeito colateral. A própolis consegue os mesmos efeitos que a penicilina, a estreptomicina, a terramicina, o clorafenicol e outros antibióticos poderosos, sem causar nenhum mal ao homem (MASSON, 1985).

No Antigo Egito a própolis já era usada como remédio e, também acreditasse, na mumificação dos faraós. Foi difundida entre os gregos que deram o nome pela qual é conhecida: **pro** (prefixo latino) que significa "antes", e **polis** (sufixo grego) que significa "cidade", numa alusão a seu papel de vedação das colméias. Citada ainda por Aristóteles como remédio para as "chagas e supurações", a própolis foi descrita pelos iranianos, incas e europeus, e hoje já está sendo redescoberta por pesquisadores como poderoso cicatrizante e anti-séptico (MILLER & LILINBAUM, 1988).

Em Cuba a própolis é alvo de outras descobertas sobre seus efeitos terapêuticos, como a cura para o vitiligo, meningite e giardíase (ANGERAMI, 1991).

Segundo KOSONOCKA (1991), a própolis originária de determinadas áreas é mais ativa biologicamente, ou seja é capaz de matar bactérias mais efetivamente do que amostras de outras áreas. Os estudos sobre o efeito cicatrizante da própolis foram iniciados por um veterinário, ARTHUR

STOJKO, o qual observou que os ferimentos de cães cicatrizavam mais facilmente quando eram tratados com a própolis.

Ainda segundo KOSONOCKA (1991), cientistas franceses descobriram dois componentes ativos da própolis; a rhamnocitrina e a pinostrobissa. Cientistas russos tentaram descobrir que árvores são a principal fonte da própolis, e embora difícil, através de análise química em comparação com o gás cromatográfico de muitas resinas, dizem que na maioria são as videiras, os choupos, e algumas vezes os carvalhos e os pinheiros. A própolis tem ainda uma ação fortalecedora do sistema imunológico e tanto a forma de tintura como granulada ajudam a manter o equilíbrio biológico geral do corpo. Tem ainda o efeito sobre alguns vírus e bactérias, principalmente as gram positivas.

VANHAELEN & VANHAELEN - FASTRÉ (1979), MASSON (1985), KOSONOCKA (1991), RAHAL & LOUREIRO BRACARENSE (1992), dizem que a própolis tem também efeitos anti-inflamatórios e analgésicos.

A própolis não deve ser tratada como um remédio milagroso, ela não traz qualquer malefício mesmo que algumas vezes não ajude, com excessão de casos de alergia, muito raro, mas que merecem atenção (MASSON, 1985; KOSONOCKA, 1991).

SZEWCZAK & GODOY (1984), sugerem para extração de tintura três métodos que utilizam basicamente o etanol a 96°GL, a própolis na proporção de 1:3 e que diferem entre si no tempo e temperatura de preparação, 36 horas à 21 graus Cécius, 24 horas à 37 a 40 graus Cécius, 24 horas utilizando um líquido extrator à 37 a 40 graus Cécius respectivamente.

BENEVIDES (1986), sugere outro método, que consiste em extração alcoólica a 50%, com 50 gramas de própolis limpa e moída mais 100 gramas de álcool a 70°GL

em um vidro âmbar deixados por 15 dias em ambiente de temperatura amena, agitados todos os dias, e várias formas de preparação de pomadas.

Existem diversas maneiras de preparar pomadas, utilizando lanolina, vaselina, tween 80, tween 60, conservantes e acidificantes, como descrevem em seus trabalhos VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRÉ (1979) e BENEVIDES (1986).

O uso de antibióticos de forma descuidada teve como consequência o alto nível de insucesso nos tratamentos das mais diversas infecções, obrigando aos médicos recorrerem a meios de diagnóstico como cultura e antibiograma de amostras colhidas destas patologias. O consequente uso de antibióticos cada vez mais potentes e tóxicos encarecem a terapia e interferem com a homeostase do ser vivo.

Com o objetivo de estudar a própolis como um antibacteriano alternativo no caso de feridas contaminadas, foi feito acompanhamento microbiológico do seu efeito *in vivo*, observando também o seu efeito cicatrizante ou sua relação com a cicatrização destas feridas. Foi testada em duas formas de apresentação, como tintura e pomada formulada, levando-se em conta a comparação com o álcool que é o diluente da tintura.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez cães sem raça definida provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria, foram divididos em dois grupos (I e II) de igual número. Na região dorsal de cada cão foram feitos quatro feridas medindo 2cm². Nos animais do grupo I: a ferida denominada "a" foi o controle; a ferida "b" foi controle com álcool; a ferida "c" recebeu tratamento com pomada formulada com a tintura de própolis, vaselina sólida e líquida; a ferida "d" foi

tratada com tintura formulada com álcool a 70% e própolis macerada.

As feridas nos animais do grupo II não receberam tratamento.

Feitas as feridas, os cães não receberam qualquer tratamento durante 48 horas para que se obtivesse uma contaminação. Após isto, no primeiro dia, antes de iniciar o tratamento foi coletada a primeira amostra de secreção, com swab, e levada ao laboratório em meio de transporte de Stuart para cultura bacteriológica. Nos animais do grupo I foram aplicados uma vez por dia, sendo que a segunda coleta de material para cultura bacteriana foi no quarto dia de tratamento. No laboratório, após cultura das amostras em meio de TSA, foi feita a identificação e contagem das colônias.

A própolis foi raspada do exterior das caixas das colméias com uma espátula, e limpa antes de pesá-la.

A tintura utilizada foi a solução alcoólica a 50%, composta por 50g de própolis limpa e moída e 100ml de álcool etílico a 70 graus GL, que foram colocados em um vidro âmbar. A mistura foi agitada por 15 minutos e deixada em ambiente escuro e temperatura amena durante 15 dias, sendo agitada uma vez ao dia. Após o décimo quinto dia a mistura envasada foi deixada na geladeira por um dia e filtrada após em papel filtro. O filtrado foi deixado em descanso por mais três dias e refiltrado.

A pomada foi formulada com 40g de vaselina sólida, 10ml de vaselina líquida e 2,5ml da tintura de própolis preparada.

A vaselina sólida e a vaselina líquida foram colocadas em um Becker, incorporadas com um bastão de vidro e em seguida foi adicionada a tintura. Esta pomada foi conservada em geladeira, assim como a tintura.

A observação dos resultados foi através de cultura e contagem das colônias antes e após o tratamento. A cicatrização

foi avaliada subjetivamente pela inspeção e observação de presença de pus, crostas e tecido de granulação.

A contagem de colônias bacterianas por ferida foram classificadas em: + poucas colônias (<300); ++ colônias distantes (>500); +++ possível evidenciar (denso); ++++ impossível evidenciá-las (muito denso).

RESULTADOS

Todos os animais apresentaram contaminação, com muita sujidade, secreção purulenta e crostas, no pós-operatório imediato. Naqueles do grupo I, a primeira coleta feita após as 48 horas foi

denominada como cultura e contagem controle, onde foram identificadas como bactérias contaminantes o **Staphylococcus aureus** e o **Streptococcus sp**, ambos beta hemolíticos, que apresentaram diferentes contagens em cada ferida e animal.

No controle laboratorial, as feridas denominadas "a" apresentaram contagens diferentes nos cinco animais e contaminação **Staphylococcus aureus** e **Streptococcus sp**. As feridas denominadas "b" (controle com álcool), também evidenciaram a presença dos mesmos agentes em diferentes contagens. O mesmo ocorreu com as feridas "c", tratamento com pomada e feridas "d", tratamento com tintura (Tabela 1).

No quarto dia de tratamento, foi

Tabela 1: Prevalência de agentes contaminantes em feridas de cães do grupo I submetidos a diferentes protocolos de tratamento.
Bactérias encontradas

Tratamento	S. aureus	(nº cães)	Streptococcus	(nº cães)
Ferida "a"	++++	(2)	++++	(1)
	+++	(1)	+++	(2)
	++	(1)	-	(2)
	+	(1)		
Ferida "b"	++	(1)	++	(1)
	+	(4)	+	(2)
Ferida "c"	++++	(1)	++++	(1)
	+++	(1)	++	(2)
	++	(3)	-	(2)
Ferida "d"	++++	(2)	++++	(2)
	+++	(1)	+	(1)
	+	(2)	-	(2)

++++ Impossível evidenciar colônias (muito denso)
 +++ Possível evidenciar colônias (denso)
 ++ Colônias distantes (> 500 colônias)
 + Poucas colônias (< 300 colônias)
 - Nenhuma colônia

feita a segunda coleta, que demonstrou uma maior redução do crescimento bacteriológico nas feridas tratadas com a própolis, em comparação com as feridas não tratadas, as quais mesmo assim apresentaram diminuição do crescimento. Os resultados obtidos após os tratamentos também variaram de animal para animal, assim como em cada ferida.

Em um animal, em comparação com os resultados da primeira coleta, houve redução do crescimento em todas as feridas e não se alteraram as bactérias encontradas na cultura inicial. A contagem indicou incidência (+++) na ferida "a", + (112,100 e 14 colônias respectivamente) nas feridas "b", "c" e "d". A bactéria encontrada foi o *Staphylococcus aureus*. Os resultados após os tratamentos nos demais cães, variaram entre si apenas nas quantidades finais de colônias.

Quanto à cicatrização, que foi avaliada pela diminuição de crostas, pus e presença de tecido de granulação, os animais do grupo I apresentaram, a cada dia, redução progressiva da contaminação e início da organização do tecido de granulação e retração cicatricial, em maior grau nas feridas tratadas.

Todos os animais do grupo I apresentaram reações semelhantes quanto a cicatrização, que foi avaliada e anotada até o oitavo dia de tratamento, quando todas as feridas apresentavam-se completamente cicatrizadas.

Através da observação subjetiva de cada ferida foram obtidos os seguintes resultados:

1. ferida "a": não recebeu tratamento. Apresentou contaminação alta em todos os animais, cicatrizou mais lentamente. No oitavo e último dia de observação ainda apresenta uma pequena crosta seca escura no centro da cicatriz;
2. ferida "b": recebeu tratamento com álcool puro como controle dos componentes da

mesma. Apresentou cicatrização semelhante à ferida "a";

3. ferida "c": recebeu tratamento com a pomada formulada, e no segundo dia da aplicação já era possível evidenciar tecido de granulação e no quarto dia, onde coletada a segunda amostra para exame bacteriológico, apresentava-se com uma pequena crosta de pomada sobre o tecido de granulação no centro da ferida;

4. ferida "d": recebeu tratamento com tintura pura, para comparação com a pomada. Apresentou cicatrização semelhante à ferida "c", exceto pela presença de secreção de aspecto purulenta, no terceiro dia de tratamento, a qual já não era mais visualizada no quarto dia.

No quarto dia de tratamento todas as feridas apresentavam tecido de granulação recobrando-as totalmente. A partir de então iniciou o processo de retração cicatricial, que no oitavo dia de observação já mostrava fechamento da ferida.

Nos animais do grupo II, que não receberam tratamento, os resultados entre as coletas efetuadas no primeiro e quarto dias mostraram contaminação (++++) na maioria dos animais. Em três cães todas as feridas tiveram crescimento muito denso.

Um animal apresentou crescimento denso na ferida controle e na ferida "b" mais que 500 colônias, as restantes apresentaram crescimento maior que 500 colônias na ferida "a" e denso na "b". As restantes apresentaram crescimento muito denso. Em todos os casos foram identificados o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus sp.* Nas feridas "c" e "d" todos os animais deste grupo apresentam crescimento (++++) e presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.*

Na segunda coleta efetuada nos cães do grupo II não houve modificação do quadro em três animais. Em um o número de colônias reduziu o crescimento denso para poucas colônias nas feridas "b" e "d".

O outro animal teve redução de crescimento muito denso para denso em todas as feridas.

Quanto a cicatrização, neste grupo, as feridas ainda apresentavam grande quantidade de crostas úmidas e pus ao décimo dia de observação, uma pequena quantidade de tecido de granulação no décimo segundo dia. No décimo quarto dia já começava a retracção cicatricial.

DISCUSSÃO

Para a resolução de feridas contaminadas são utilizadas diversas terapêuticas com antibióticos, anti-sépticos e outros produtos. Na maioria das vezes em que não se tem resultados com a terapia inicial faz-se cultura e antibiograma da secreção da ferida para identificar a flora e sua sensibilidade. Neste estudo comprovou-se que na flora identificada, *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus sp*, a própolis agiu satisfatoriamente, diminuindo o crescimento destas cepas, ficando claro o efeito antibacteriano sobre estes microorganismos gram-positivos. Estes resultados estão de acordo com MILLER & LILENBAUM (1988), SZEWCZAK & GODOY (1984), MIROLYUBOV & BARSKOV (1980), em seus estudos de sensibilidade de própolis sobre estas bactérias.

No presente estudo, não foi avaliada a importância da própolis em outras doenças, mas a citação dos autores sobre seus efeitos em doenças de pele como acne, calo, eczema, eritema, piodermite, herpes, lupus, queimadura, vitiligo, micose e outras doenças tanto externas como internas (MASSON, 1985; ARGERAMI, 1991; KOSONOCKA, 1991), sugere que em dermatoses que envolvam contaminações com os agentes aqui encontrados pode-se utilizá-la como alternativa de tratamento.

A amostra de própolis utilizada, que

foi recolhida da parte externa de algumas colméias localizadas próximas a diversas árvores frutíferas e outras espécies encontradas nos campos do Rio Grande do Sul, demonstrou que se for livre de impurezas, e devidamente extraída, pode exercer os mesmos efeitos de outras amostras. Embora BENEVIDES (1986), diga que deva ser dada preferência à própolis coletada de telas e sobreninho, pois a que localiza-se externamente é de baixa qualidade.

A apresentação em forma de pomada foi melhor que a alcoólica, pois a forma sólida permanece sobre a ferida, o que não acontece com a tintura. Concordam com esta afirmação, VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRÉ (1979); que dizem ser o álcool o melhor veículo para a preparação de tinturas e extratos e a mistura destas com a lanolina, vaselina, parafina e outros veículos oleosos, juntamente com conservantes ou não, para o uso de cosmético e terapêutico, pois qualquer uma delas mantém a atividade antibacteriana.

A técnica utilizada para a obtenção da própolis foi satisfatória, dados os resultados presentes neste trabalho, o que constitui um fator importante na ação inibidora de microorganismos conforme citaram SZEWCZAK & GODOY (1980).

As técnicas utilizadas, conforme BENEVIDES (1986), de extração da tintura e de formulação da pomada demonstraram ser fáceis de preparar, além de exigir pouco material especializado, o que torna o procedimento mais econômico e tão eficiente quanto às outras técnicas.

Os resultados da pesquisa aqui efetuada demonstram que a própolis exerce ação inibidora ao *Staphylococcus aureus* e ao *Streptococcus sp in vivo*, o que viabiliza sua utilização terapêutica conforme sugerem MILLER & LILENBAUM (1988) que fizeram estudos *in vitro*.

Quanto ao poder cicatrizante da própolis, comprovou-se que as feridas dos animais tratados cicatrizaram mais rapidamente, mesmo a ferida "a" controle, devido à sua proximidade com as demais. Estes resultados estão de acordo com ARTHUR STOJKO apud KOSONOCKA (1991), MASSON (1985), RAHAL & LOUREIRO BRACARENSE (1992).

Foi comprovado o efeito anti-inflamatório e analgésico da própolis, dada a redução do edema das feridas e a atitude calma dos animais em relação às mesmas, conforme citaram VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRÉ (1979), MASSON (1985), KOSONOCKA (1991), RAHAL & LOUREIRO BRACARENSE (1992).

CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos é possível concluir que:

1. A própolis nas formas de tintura e pomada exerce efeito antibacteriano sobre o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus sp.*
2. A própolis tem efeito anti-inflamatório, analgésico, antibacteriano, e favorece a cicatrização de feridas contaminadas em cães; recomenda-se utilizar a formulação em pomada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGERAMI, S. Cuba descobre novos efeitos terapêuticos da própolis. Apiterapia. *Revista Brasileira de Apicultura*, v.8, n.4, p.18-20, 1991.
- BENEVIDES, L.H.T.S. Tintura e pomadas de própolis. *Apicultura e polinização*, v.6, n.33, p.6-7, 1986.
- KOSONOCKA, L. Própolis fortalece o sistema imunológico. *Revista Brasileira de Apicultura*, v.5, p.22-24, 1991.
- MASSON, B. *Vida Natural*. 2 ed. São Paulo: Global/Ground, 1985. v.8, Própolis um antibiótico natural, 67p.
- MILLER, A.F., LILENBAUM, W. Própolis: avaliação da ação antibacteriana *in vitro*. *Ciência Médica*, v.7, n.1/2, p. 29-33, 1988.
- MIROLYUBOV, M.G., BARSKOV, A.A. Própolis e mastite. *Vet Moscou*, v.2, p.45-46, 1980.
- RAHAL, S.C., LOUREIRO BRACARENSE, A.P.F.R. Efeito do tratamento com açúcar, mel própolis e soro fetal bovino na cicatrização de feridas de segunda intenção em ratos, In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 1992. Curitiba, PR. Sociedade Paranaense de Medicina Veterinária, 1992. n.p. (Resumo nº 22).
- SZEWCZAH E.H., GODOY, G.F. Estudo comparativo entre a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* à própolis e à antibióticos. *Apicultura no Brasil*, São Paulo, ano 2, n.4, p.28-29, 1984.
- VANHAELEN, M., VANHAELEN-FASTRÉ, R. Própolis - I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. *J Pharm*, v.34, p.253-259, 1979.