



EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS VERDE

**Amanda T. SANTINI¹; Carolina L. SILVA²; Flávia A. GALERA³; Polyana F. CARDOSO⁴; Edivaldo
A. N. MARTINS⁵; Ingridy S. RIBEIRO⁶**

RESUMO

A própolis, uma resina de origem vegetal, extraída e elaborada naturalmente pelas abelhas *Apis mellifera* L., tem sido considerada um dos produtos naturais mais utilizados pelo homem como alternativa na manutenção de sua saúde. A própolis apresenta efeitos bactericida contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Sua atividade antimicrobiana está relacionada aos flavonoides e outros compostos fenólicos encontrados neste produto. O objetivo do trabalho foi avaliar se a variação da concentração de etanol interfere na atividade antibacteriana do extrato de própolis verde. O extrato foi preparado utilizando-se etanol de 50 a 100% (v/v) e a atividade antibacteriana foi avaliada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Teste de difusão. A própolis estudada não apresentou CIM e CBM contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, porém apresentou atividade contra *M. luteus*, halos variando entre 1,4 e 2,1 cm. Concluiu-se que é necessário estudos mais aprofundados em relação à própolis do IFSULDEMINAS – Campus Muzambinho para averiguar se o produto não apresenta quantidades significativas de compostos antibacterianos.

Palavra-chave: Produtos Naturais; Própolis; Atividades biológicas.

1. INTRODUÇÃO

A busca incessante pela compreensão da natureza e o desafio da sobrevivência levaram o homem à pesquisar e utilizar cada vez mais os produtos naturais, sejam eles de origem vegetal, animal ou microbiológica, para aumentar sua qualidade e expectativa de vida. Nesse contexto, a própolis constitui-se uma resina de origem vegetal, elaborada naturalmente pelas abelhas, sendo considerada um dos produtos naturais mais utilizados pelo homem como alternativa na manutenção de sua saúde (PINTO et al., 2002; ANDRADE et al., 2012).

De acordo com Sforcin e colaboradores (2000), muitos autores têm estudado as atividades biológicas da própolis, dentre elas, a atividade antimicrobiana. Estudos revelam que a própolis tem efeitos bactericidas contra agentes causadores de diversas infecções, como bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas. A atividade antimicrobiana da própolis está relacionada aos flavonoides e outros componentes fenólicos presentes nesse produto.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou analisar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos etanólicos de própolis verde obtida no apiário do IFSULDEMINAS - Campus Muzambinho, variando a concentração do etanol no solvente extrator.

¹ IFSULDEMINAS – campus Muzambinho. E-mail: amandatsantini@gmail.com

² IFSULDEMINAS – campus Muzambinho. E-mail: linacarolina0@gmail.com

³ IFSULDEMINAS – campus Muzambinho. E-mail: flaviagalera@hotmail.com

⁴ IFSULDEMINAS – campus Muzambinho. E-mail: pdf.cardoso@hotmail.com

⁵ IFSULDEMINAS – campus Muzambinho. E-mail: edivaldonm@gmail.com

⁶ IFSULDEMINAS – campus Muzambinho. E-mail: ingridy.ribeiro@muz.ifsuldeminas.edu.br



2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Preparo das Amostras

A própolis foi obtida no apiário do IFSULDEMINAS - Campus Muzambinho. Foi armazenada a -18°C no Laboratório de Bromatologia e Água da mesma instituição. Para o preparo dos extratos, a própolis foi triturada mediante adição de nitrogênio líquido e homogeneizada.

A própolis bruta triturada foi submetida à extração utilizando-se diferentes concentrações de solução etanólica. A primeira concentração utilizada foi de etanol 50% (v/v), seguindo de etanol 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Foram pesados 20 g de própolis bruta e adicionados 200 mL de solução etanólica com a variação de concentrações já citadas. A extração foi então realizada a 70°C em banho de água termostatizado durante 30 minutos com agitação constante.

As amostras foram deixadas em repouso a 8°C durante 24 horas para que houvesse a decantação da cera e posteriormente foram filtradas em papel filtro com o auxílio de bomba à vácuo. Os extratos foram secos em estufa de circulação de ar forçado a 60°C por aproximadamente três dias, até peso constante, para a obtenção do extrato concentrado, também conhecido como extrato mole

Atividade Antibacteriana

De acordo com a metodologia descrita por Cabral (2008), a atividade antibacteriana foi realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), realizando-se posteriormente a análise do teste de difusão. Para as análises CIM e CBM, os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 0538 e *Escherichia coli* ATCC 8739 foram inicialmente reativados a partir das culturas estoque. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram suspendidas em uma solução de NaCl 0,9% estéril e ajustadas para o equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL utilizando-se a escala 0,5 de Macfarland. Um volume de 50 μL das suspensões bacterianas foram inoculadas em 50 mL do meio BHI líquido, de modo a se obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL. A técnica foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 180 μL de caldo BHI previamente inoculado. Em seguida, foram adicionados 10 μL do extrato etanólico de própolis em concentrações que variaram de 20 mg/mL a 0,156 mg/mL (diluição seriada de razão 2). As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, foram adicionados 20 μL do corante Resazurina (0,01% m/v) para verificar o crescimento bacteriano. Nos poços em que não houveram a mudança na cor do corante em comparação ao controle, foi considerada ausência de bactérias viáveis.



Qualquer evidência na mudança de coloração, considerou-se crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM, alíquotas de 10 µL do meio de cultura dos poços considerados inibitórios foram semeadas em BHI ágar a 37°C durante 24 h.

Para o teste de difusão, os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus* foram inicialmente reativados a partir de culturas estoque e padronizados conforme descrito na metodologia da CIM. A inoculação em meio de cultura BHI ágar foi feita por meio da técnica de swab. Em poços feitos no ágar nutriente solidificado, foram adicionados 40 µL de soluções dos extratos etanólicos de própolis em concentrações de 20 mg/mL e 40 mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 h. A leitura dos resultados foi feita pela medição do diâmetro do halo, em cm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à análise de CIM e CBM, nenhum dos extratos preparados conseguiu inibir o crescimento dos micro-organismos testados. Apesar da própolis apresentar compostos bioativos, possivelmente eles não se apresentaram em concentrações suficientes para inibir o crescimento bacteriano. A atividade antimicrobiana ligada à própolis pode estar relacionada à compostos termossensíveis e possivelmente estes foram destruídos durante o período de secagem em estufa, já que os extratos ficaram cerca de três dias em estufa de circulação de ar forçado a 60°C. Esse resultado contraria os resultados encontrados por Cabral et al. (2012) que obteve resultados positivos em relação à inibição da bactéria *S. aureus* pelos extratos etanólicos confeccionados, porém tais autores utilizaram evaporador rotativo para a concentração dos extratos. Ainda, Júnior et al (2006) obteve resultados que demonstraram o poder inibitório e bactericida de extratos etanólicos de própolis verde contra *E. coli* e *S. aureus*.

Em relação ao teste de difusão, nas placas onde foi inoculado *M. luteus* apresentaram halo inibitório de 1,7 cm (etanol 50%), 1,5 cm (etanol 60%), 1,6 cm (etanol 70%), 1,8 cm (etanol 80%), 1,7 cm (etanol 90%) e 1,6 cm (etanol 100%) para os extratos na concentração de 20 mg/mL. Em relação aos extratos na concentração de 40 mg/mL, a medida do halo inibitório obtida foi de 2,1 cm (etanol 50%), 2,0 cm (etanol 60%), 1,4 cm (etanol 70%), 2,0 cm (etanol 80%), 1,7 cm (etanol 90%) e 1,7 cm (etanol 100%). Não foram observados halos inibitórios nas placas onde as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. foram inoculadas. Os resultados obtidos para *E. coli* e *S. aureus* confirmam a baixa quantidade de compostos bioativos nos extratos etanólicos de própolis analisados.



4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir por meio deste trabalho que a amostra de própolis utilizada apresentou atividade somente com *M. luteus*, em altas concentrações, no teste de difusão. Torna-se, portanto, necessária a elaboração de trabalhos mais aprofundados para se verificar se esta amostra realmente possui baixo teor de compostos antimicrobianos ou se o método de extração precisa ser adaptado para não inativar tais substâncias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N. P. C.; SILVA, E. M. S.; MOTA, R. A.; VESCHI, J. L. A.; RIBEIRO, M. F.; KREWE, C. C.; COSTA, M. M. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos etanólicos de própolis de três estados brasileiros sobre *Aeromonas hydrophila* isoladas de peixes. **Arquivos do Instituto Biológico.**, São Paulo, v. 79, n.1, p. 9-15, jan./mar., 2012.

CABRAL, I. S. R. *et al.* The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, 2012.

CABRAL, I. S. R.; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.

JÚNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* propolis from three regions of Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.1, p.294-297, jan-fev, 2006.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, vol. 25, supl. 1, p. 45-61. 2002.

SFORCIN, J. M.; JÚNIOR, A. F.; 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.