

Revisão da metodologia de extração de própolis para análises antimicrobianas

Review of the propolis extraction methodology for antimicrobial analysis

RESUMO

Luiz Henrique Mores

luizmores@alunos.utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Elizabete Satsuki Sekine

esekine@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Simone Bowles

sisibowles@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

O uso de produtos provenientes das abelhas para diversos fins, especialmente para práticas medicinais é conhecido desde as civilizações antigas. Um destes produtos é a própolis, que possui atividade antimicrobiana conhecida, e é produzida pelas abelhas para defesa da colônia. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento na literatura especializada a fim de verificar a metodologia utilizada para extração da própolis para estudos de atividade antimicrobiana. Existem diversas metodologias para o preparo do extrato, a maioria utilizando etanol comum ou álcool de cereais, diferindo no tempo de extração, concentração, temperatura, agitação, entre outros fatores relevantes. O teste com discos foi o método mais observado para a mensuração dos resultados. Os resultados de halo de inibição obtidos pelos estudos foram bem promissores, em alguns casos até superando o halo formado por discos de antibiótico.

PALAVRAS-CHAVE: Halo de Inibição. Atividade antimicrobiana. Extratos alcoólicos.

ABSTRACT

The use of products from bees for various purposes, especially for medicinal practices, is known since ancient civilizations. Propolis has a known antimicrobial activity, and bees produce it to defend the colony. The objective of this work was to carry out a survey in the specialized literature, in order to verify the methodology used to extract propolis for studies of antimicrobial activity. Several methodologies were found for obtaining the extract, most of them using common ethanol or cereal alcohol, differing on the extraction time, concentration, temperature, agitation, among other important factors. Disc testing was the most observed method for measuring the results. The halo of inhibition results obtained by the studies were very promising, in some cases even surpassing the halo formed by antibiotic discs.

KEYWORDS: Halo of inhibition. Antimicrobial activity. Ethanolic extracts.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Registros revelaram, desde as civilizações antigas, como a chinesa, greco-romana, tibetana e egípcia, o uso de produtos provenientes das abelhas para diversos fins, especialmente para práticas medicinais. Dentre esses produtos, os mais encontrados nas receitas foram própolis, larvas de abelhas e o mel (Lacerda *et al.*, 2011).

Tendo esse registro histórico como base, observa-se a importância desses produtos ao longo da história da humanidade, enfatizando a necessidade de se estudar as propriedades bioativas desses compostos. Dessa forma, é possível entender os mecanismos de ação de cada substância e sua efetividade, permitindo abrir novos horizontes de aplicação desses produtos para as mais diversas áreas.

É nesse contexto que se encaixa esta pesquisa, a qual objetiva estudar, com base na literatura, a ação antimicrobiana da própolis proveniente de abelhas sem ferrão em algumas espécies de bactérias e fungos.

Nos últimos anos, houve um aumento da busca por substâncias com princípios ativos, tanto de origem animal quanto vegetal, e é nesse ambiente que entram as várias pesquisas relacionadas à própolis. A própolis tem uma composição complexa e variada, sendo os flavonoides os principais responsáveis pela sua atividade antibacteriana (Sinhorini *et al.*, 2014).

Segundo Sforcin & Bankova (2011) e Kacaniová *et al.*, 2012; Fagundes *et al.*, 2014), citados por Campêlo *et al.* (2015), a própolis é uma resina, recolhida pelas abelhas a partir de várias plantas, que apresenta uma grande variedade de efeitos farmacológicos.

A própolis das abelhas sem ferrão já demonstrou capacidade antifúngica e antibacteriana, sendo utilizado principalmente como revestimento comestível (Campêlo *et al.*, 2015). As variações na sua composição e atividade antimicrobiana podem ser explicadas, de acordo com Wilson *et al.* (2015), pela diversidade vegetal e climática da região, já que esses fatores estão relacionados com os constituintes bioativos.

O objetivo deste trabalho foi verificar, na literatura especializada, metodologias utilizadas para a obtenção do extrato, bem como a atividade antimicrobiana da própolis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão frente a diferentes espécies de microrganismos.

METODOLOGIA

Diante da impossibilidade de dar continuidade às atividades práticas previstas no projeto, durante período de suspensão das atividades presenciais em respeito às recomendações da Organização mundial da Saúde, foi realizada uma revisão bibliográfica, permitindo mapear os valores de halo de inibição já encontrados na literatura, assim como as metodologias empregadas para a obtenção dos extratos e das atividades antimicrobianas da própolis, o que auxiliará em futuras pesquisas relacionadas a esse assunto.

A pesquisa de artigos foi realizada utilizando palavras chave como: extratos alcoólicos, atividade antimicrobiana, abelhas sem ferrão, coleta, armazenamento

e manuseio da própolis. Foram utilizadas as bases de dados *Elsevier*, *Journal of Veterinary Science and Public Health*, *Acta Veterinaria Brasilica*, *National Library of Medicine* e *SciELO*.

As principais informações coletadas foram as metodologias utilizadas para o preparo da própolis e a atividade antimicrobiana. Diversas concentrações e metodologias foram observadas nos artigos avaliados, fato que afeta diretamente nos resultados obtidos em cada um deles.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos artigos pesquisados, o foco principal foi mensurar a atividade antimicrobiana do extrato de própolis através do halo de inibição formado, comparando-os com os de antibióticos. Em um dos artigos, o objetivo foi avaliar três metodologias distintas para a extração e preparo do extrato da própolis.

Há diversas maneiras de se preparar um extrato de própolis, variando principalmente na quantidade de dias para o preparo, assim como a concentração e tipo de solvente. Todas essas variáveis podem influenciar nos resultados finais da atividade antimicrobiana.

Em um estudo de Campêlo *et al.* (2015), foi utilizada a própolis de dois tipos de abelhas sem ferrão (Jataó e Cupira), testando seus extratos em três cepas bacterianas (*Enterobacter aerogenes* (ATCC 1304), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)). Foi realizada uma trituração da própolis, pesagem e banho-maria (45°C) por 7 dias. Um extrato hidroalcolóico foi adquirido ao se adicionar álcool 70% na proporção de 3:7 (m/v) da amostra triturada. Durante os sete dias foi realizada agitação de 30 segundos ao dia, ao término foi filtrado com papel filtro e armazenado em vidro âmbar. O extrato foi testado puro (100ug/ml) e diluído em água. As bactérias foram suspensas em meio BHI. Segundo o autor, o método utilizado para o teste com os extratos foi o da difusão em disco, recomendado pelo CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute).

Na pesquisa de Sinhorini *et al.* (2014), utilizou-se uma própolis comercial sendo a diluição 70% própolis e 30% álcool de cereal. A reconstituição das bactérias se deu em meio líquido de TSB incubados (37°C) por 4 h. Depois, o autor semeou 104 UFC e cada microrganismo em Agar Muller Hinton com concentrações de 1%, 5% e 10% de própolis, deixou-se em estufa (37°C) por 24h. Foram realizadas mais três etapas nesse mesmo formato testando diversas concentrações de própolis no meio para todas as bactérias do estudo, sempre em triplicata.

Em estudo realizado por Portilho *et al.* (2013), testou-se 11 amostras diferentes de própolis em quatro espécies de bactérias (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), e *Escherichia coli* (ATCC 25922)), e 2 espécies de fungo (*Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida tropicalis* (ATCC 28707)). Os extratos foram obtidos pela técnica de maceração, com etanol 83,8% na proporção de 1:3 (p/v), durante 20 dias sob agitação constante. Os discos esterilizados, de papel filtro, continham 7mm de diâmetro e foram embebidos no extrato e secos por 15 minutos em fluxo laminar. Os inóculos dos microrganismos foram preparados seguindo as normas M27-A2 e M7-A6, adicionando 100uL de bactérias

previamente cultivados no mesmo meio do teste: Ágar Muller Hinton. Com a adição dos discos embebidos o autor deixou em estufa (37°C) entre 24 e 48h.

Vale ressaltar que em todos esses estudos utilizou-se controle negativo com o solvente utilizado e controle positivo com a utilização de diversos discos de antibióticos para comparação, com exceção de Sinhorini *et al.* (2014), o qual não fez uso de antibióticos em seu trabalho.

Três métodos para se realizar o preparo do extrato de própolis foram propostos por Moroni *et al.* (2020), sendo eles: Extrato Aquoso de Própolis (EAP), Extrato Tweenólico de Própolis (ETP) e Extrato Etanólico de Própolis (EEP). No EAP misturam-se 500ml de água deionizada com 100g de própolis triturada. Após 24h realiza-se um banho-maria (80°C) por 2 horas e então se turboliza a solução em liquidificador. Filtra-se a mistura com auxílio de funil de Kitassato, deixando por 48h, depois é só suspender o pó resultante em água, escolhendo a concentração desejada.

A metodologia ETP consiste em se adicionar 500ml de água deionizada com 25g de Tween 80, agita-se até a homogeneidade e então se adiciona 100g de própolis triturada. Os passos seguintes são idênticos aos do EAP.

No método EEP mistura-se a própolis triturada com 500 ml de álcool 80% e agita-se por 30 minutos. Em seguida turboliza-se essa mistura em liquidificador e então filtra-se com funil de Kitassato. O filtrado pode ser seco em chapa aquecedora a 75°C, fazendo a suspensão em etanol 80% no volume desejado.

Moroni *et al.* (2020) conclui que as duas primeiras metodologias podem ser utilizadas em vários tipos de ensaios biológicos, onde não pode se ter etanol na composição. Na ocasião, o pesquisador utilizou a própolis bruta da *Apis mellifera*.

Boa atividade antimicrobiana (sensibilidade do microrganismo) para bactérias Gram positivas, mesmo em concentrações baixas de própolis (0,1%) e para Gram negativas a partir da concentração de 3% foram relatadas para Sinhorini *et al.* (2014), utilizando uma própolis com diluição de 30% de álcool cereal em seu extrato. Para o autor, essa maior resistência das bactérias Gram negativas se deve à uma maior concentração lipídica e complexidade química da parede celular desse grupo.

Através de triplicata do método de Kirby-Bauer no estudo de Campêlo *et al.* (2015), obteve-se valores de halo de inibição de até 11,3mm com Jati e 10,6mm com Cupira contra a *S. aureus*, ambas em concentração de 100ug/ml, não sendo muito efetivas contra a cepa de *E. coli*. Os extratos diluídos em água não apresentaram atividade inibitória para as bactérias testadas.

O estudo realizado por Portilho *et al.* (2013) com 11 amostras diferentes de própolis apresentou resultados muito promissores de halo de inibição, alguns com valores muito próximos e superiores aos obtidos com discos padrões de antibiótico. Como é o caso da Eritromicina e Gentamicina para *S. aureus* (10 e 12mm respectivamente) e Penicilina (10mm), Amoxicilina (12mm) e Gentamicina (20mm) para *S. epidermidis*. Para *S. aureus* 3 amostras de própolis tiveram halo de inibição entre 10 e 11mm, e para a *S. epidermidis* todas as 11 amostras tiveram resultado, variando de 11 até 17mm de inibição.

Para a atividade antifúngica das amostras, obteve-se halos de inibição variando entre 11 a 15mm para *C. alicans* e de 10 a 16mm para *C. tropicalis*. Mas

um resultado conclusivo não pode ser realizado pelo fato do antifúngico utilizado para comparação (Clotrimazol) não ter gerado nenhum halo de inibição.

CONCLUSÕES

Observa-se uma grande amplitude de possibilidades de estudos com o própolis a fim de entender melhor seus mecanismos biológicos. O fato de sua composição variar conforme a região aumenta ainda mais essas possibilidades. Espera-se que no futuro esse composto possa ser melhor aproveitado em diversas áreas do mercado, beneficiando as pessoas pelo seu uso, principalmente com os estudos de sua atividade antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

CAMPÊLO, M.C.S., FREIRE D.A.C., ABRANTES M.R., SOUSA E.S. & SILVA J.B.A. 2015. Potencial antimicrobiano de própolis e cera de diferentes espécies de abelhas sem ferrão. Acta Vet. Bras. 9(4):397-400. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/5406/5861>. Acesso em: 20 jun. 2020.

LACERDA, R. C. C.; TIVERON, A. P.; ALENCAR, S. M. DE. Própolis e Segurança Alimentar. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2011. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8634682/2601>. Acesso em: 20 jun. 2020.

MORONI, Fábio. Ca – 6. Bioquímica Novos métodos para diluição de extratos de própolis. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 61, 2020, Manaus. Novos métodos para diluição de extratos de própolis. Manaus: Sbpcc, 2020. p. 1-2. Disponível em: <http://www.sbpccnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/5364.htm>. Acesso em: 20 jun. 2020.

PORTILHO D.R., MELO I.A., GUERRA R.C., BATISTA H.L. & FERNANDES C.H.C. 2013. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no Estado de Tocantins. Revta Cient. ITPAC 6:1-8. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v36n4/1678-5150-pvb-36-04-00279.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2020.

SINHORINI, W. A., BORDIN, J. T., VIGNOTO, V. K. C., CARDOZO, R. M., MARTINS, R. R. e WOSIACKI, S. R. (2014). Atividade antibacteriana in vitro da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública. 1: 107-111. Disponível em: http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevCiVet/article/view/24300/pdf_44. Acesso em: 20 jun. 2020.

WILSON, M.B., BRINKMAN, D., SPIVAK, M., GARDNER, G. & COHEN, J.D. 2015. Regional variation in composition and antimicrobial activity of US própolis against *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 44–50. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022201114001657?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jun. 2020.