

Técnicas microbiológicas aplicadas ao controle de qualidade de própolis

Microbiological techniques applied to quality control of propolis

RESUMO

Amanda Vitoria Elgert Becker
amandaveb15@gmail.com
Colégio Estadual Jardim Porto
Alegre, Toledo, Paraná, Brasil

Tatiana Shioji Tiuman
tatianatiuman@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
Do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

Própolis é uma substância viscosa formada por produtos coletados de plantas e substâncias produzidas pelas abelhas. Na região oeste do Paraná há grande produção de mel, porém não há produção de própolis para comercialização. Este trabalho teve como objetivo estudar técnicas aplicadas ao controle de qualidade microbiológico de amostras de própolis com a finalidade de realizar análises e incentivar a produção regional. Foi possível o estudo de normas de biossegurança e técnicas aplicadas em microbiologia, treinamento de procedimentos empregados na esterilização de materiais para análise microbiológica e treinamento para preparo de meios de cultura e esterilização em autoclave. Desta forma, alguns procedimentos e técnicas utilizadas no laboratório de microbiologia puderam ser estudados e vivenciados com o intuito da utilização correta nas análises microbiológicas referentes ao controle de qualidade de amostras de própolis.

PALAVRAS-CHAVE: Meios de cultura. Esterilização. Microbiologia.

Recebido: 03/09/2020

Aprovado: 02/10/2020

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



ABSTRACT

Propolis is a viscous substance formed by products collected from plants and substances produced by bees. In the western region of Paraná there is a large production of honey, but there is no production of propolis for commercialization. This work aimed to study techniques applied to the microbiological quality control of propolis samples in order to carry out analyzes and encourage regional production. It was possible to study standards of biosafety and techniques applied in microbiology, training procedures used in the sterilization of materials for microbiological analysis and training for the preparation of culture media and sterilization in autoclave. In this way, some procedures and techniques used in the microbiology laboratory could be studied and experienced in order to use them correctly in microbiological analyzes related to the quality control of propolis samples.

KEYWORDS: Culture medium. Sterilization. Microbiology.

INTRODUÇÃO

Em uma colmeia além do mel, cera, pólen e geleia real podemos obter a própolis. A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas através das enzimas salivares, é bem conhecida, mas não é muito produzido para a venda (BROGLIATO, 2018; LUSTOSA et al., 2008). As abelhas coletam diferentes resinas ou secreções de várias espécies vegetais, que utilizam no interior das colônias e são principalmente denominadas própolis na indústria da apicultura. A própolis tem vários benefícios como atuar contra o processo de inflamação, a melhora na imunidade do organismo, função antioxidante e antifúngica (MORAES, 2019).

A própolis tem tido um lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Isto se deve principalmente à descoberta das inúmeras atividades biológicas atribuídas aos seus principais componentes químicos. No Brasil encontramos uma vasta variedade de própolis, que são classificadas em 12 grupos com base nas diferentes características físico-químicas, assim distribuídas: 5 na região sul do Brasil, 6 no Nordeste e 1 no Sudeste (MARTINEZ; SOARES, 2012).

A grande variedade de plantas no Brasil se reflete na produção de própolis. A variedade é expressa por uma combinação de várias plantas, produzindo produtos diferenciados em cada área. Esse recurso torna a indústria competitiva e se destaca nacional e internacionalmente. As condições climáticas e de vegetação também contribuem para esse tipo de produção. De acordo com dados do Sebrae, somente Minas Gerais produz 29 toneladas de própolis, representando 70% de toda a produção brasileira (RICARDO, 2019).

O estado do Paraná é muito conhecido pela produção de mel, porém a própolis não é muito encontrada para venda. Segundo dados da cooperativa Coofamel, somente na região Oeste do Paraná existem 278 trabalhadores na apicultura, para os quais esta produção é uma oportunidade de sustento para suas famílias (PORTAL DA CIDADE DE SANTA HELENA, 2019). Como o foco principal destes produtores é o mel, a intenção deste projeto é fazer o controle de qualidade microbiológico de amostras de própolis produzidas na região para incentivar na produção.

Trabalhos como este foram pouco desenvolvidos sobre a qualidade, composição química e as propriedades biológicas da própolis regional do oeste do Paraná. Desta forma, é muito importante a realização do controle de qualidade microbiológico de amostras de própolis a fim de verificar possíveis contaminações. A aplicação das técnicas corretas no laboratório é essencial para que não ocorra problemas de contaminação, como por exemplo, a esterilização dos materiais utilizados por meio da autoclave, utilização dos EPIs e a limpeza constante das mãos.

Além disso, para a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal e a determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (LUSTOSA et al., 2008). Com base no exposto, este projeto visou realizar o controle da qualidade microbiológico de amostra de própolis, em particular produzidos na região Oeste do Paraná. Este controle é de grande importância, pois ajudará pequenos apicultores a terem um incentivo e obterem mais

compreensão sobre a própolis produzida na região. Assim, este trabalho objetivou inserir o aluno do ensino médio na rotina de um laboratório de microbiologia a fim de aplicar técnicas corretas para as análises microbiológicas de controle de qualidade de amostras de própolis.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo de normas de biossegurança e técnicas aplicadas em microbiologia, primeiramente foi realizado o estudo das normas de biossegurança, a maneira de esterilização de materiais e riscos biológicos, pois o estudo das normas de biossegurança é muito importante e essencial, tendo em vista que ela é um conjunto de ações voltadas para a prevenção e eliminação ou minimização de riscos que possam afetar a saúde do homem de animais e do meio ambiente.

Foi estudado e realizado um treinamento sobre os procedimentos empregados na esterilização de materiais para análise. A esterilização de materiais é de suma importância e deve ser priorizada em todos os laboratórios, pois através dela é possível destruir microrganismos. Através da autoclave que se encontra o método mais eficaz de esterilização (BANCADA PRONTA, 2017).

A lavagem de tubos de ensaio, pipetas, placas de Peri devem ser muito bem lavados manualmente com vários enxagues para evitar possíveis contaminações.

A secagem das vidrarias deve-se deixar escorrer toda a água e colocar papel toalha ao fundo de um recipiente. Colocar a vidraria na posição emborcada sobre o papel. Secar na estufa a 60 °C pelo tempo necessário.

Após a secagem destes é essencial o acondicionamento. É necessário adicionar adequadamente e esterilizar as peças na autoclave a 121 °C por 15 a 20 minutos ou na estufa (calor seco) a 170 °C por duas horas (TORTORA et al., 2017). Tubos, garrafas e balões são fechados com tampões de algodão hidrófobo não demasiadamente soltos nem demasiadamente apertados.

Foi realizada a atividade de treinamento no laboratório da UTFPR-Toledo, no qual consistia no preparo do meio de cultura. Foi preparado o caldo simples, utilizando os seguintes materiais: extrato de carne (5,0 g), peptona (10,0 g) cloreto de sódio (5,0 g) e água destilada (q.s.p. 1000 mL), pH 7,0 (TIUMAN, 2018b).

O preparo deste caldo simples consistia em pesar os ingredientes do meio de cultivo; dissolver em água destilada fria; agitar os constituintes em um copo béquer no agitador magnético até completa dissolução dos componentes, ou, caso não fosse obtida a dissolução total dos constituintes do meio, aquecer, agitando frequentemente até a completa dissolução. O meio foi distribuído em tubos que foram fechados e autoclavados a 121 °C por 15 minutos (TIUMAN, 2018b).

Também foi preparado o ágar simples inclinado (em tubo) no qual seguiria a mesma reparação do caldo simples, mas antes de autoclavar adicionar 20,0 g de ágar bacteriológico (para 1000 mL de meio de cultura). Foi aquecido em chapa aquecedora com agitação ou no micro-ondas agitando sempre até dissolução do ágar. Foi distribuído 5,0 mL por tubo de ensaio. Os tubos foram adequadamente

fechados e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Os tubos foram inclinados em ângulo adequado para solidificar o ágar em rampa. Foi realizado o teste de esterilidade, deixando os meios de cultura em estufa a 35 °C (TIUMAN, 2018b).

Outro preparo foi o ágar simples em placa que consistia no mesmo método do ágar simples em erlenmeyer. O frasco foi fechado adequadamente e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Esperou-se que o meio esfriasse até cerca de 45 °C. Destampou-se o frasco na zona estéril de um bico de Bunsen, flambando-lhe a boca para inativar eventuais micro-organismos. Distribuiu-se cerca de 15- 20 mL de meio por placa de Petri, abrindo-se esta ao lado da chama do bico de Bunsen (TIUMAN, 2018b).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo de normas de biossegurança e técnicas aplicadas em microbiologia

A biossegurança compreende o estudo dos riscos a que os profissionais de laboratórios estão expostos frequentemente em suas atividades e nos ambientes de trabalho. Avaliação destes riscos envolve vários aspectos, como os relacionados às boas práticas em laboratório (BPLs), aos agentes biológicos manipulados, à infraestrutura dos laboratórios ou informacionais, como a qualificação das equipes.

Os guias de biossegurança são uma combinação de controle de engenharia, políticas de gerenciamento, práticas e procedimentos de trabalho, tanto quanto intervenções médicas. A biossegurança no país só se estruturou, como área específica, nas décadas de 1970 e 1980, em decorrência do grande número de relatos de graves infecções ocorridas em laboratórios e também de uma maior preocupação em relação às consequências que a manipulação experimental de animais, plantas e micro-organismos poderia trazer ao homem e ao meio ambiente (PENNA et al., 2010).

Os agentes biológicos apresentam um risco real ou potencial para o homem e para o meio ambiente. Diante disso, é crucial montar uma estrutura laboratorial que se adapte à prevenção. Para minimizar os riscos inerentes à manipulação dos agentes microbiológicos é importante conhecer as suas peculiaridades, as quais se destacam o grau de patogenicidade, o poder de invasão, a resistência a processos de esterilização, a virulência e a capacidade mutagênica. Os agentes biológicos foram classificados em classes de 1 a 4, de acordo com menor ao maior risco, incluindo também a classe de risco especial (PENNA et al., 2010).

Os laboratórios de microbiologia geralmente são utilizados para ensino e pesquisas de várias metodologias e são utilizados vários reagentes, soluções e amostras biológicas. Diante disso, existe grande risco de exposição à contaminação por parte de professores e alunos e demais pessoas que por ali transitam. Sendo assim, é essencial o conhecimento de normas de biossegurança (PENNA et al., 2010).

A biossegurança tem várias normas que recomendam a diminuição da exposição de trabalhadores a riscos e a prevenção de contaminação ambiental. É necessário que todo laboratório forneça barreiras de contenção e um programa de segurança da qual o objetivo seja a proteção dos profissionais de laboratório e

outros que atuem na área, tal como a proteção do meio ambiente, garantia do controle de qualidade do trabalho executado e eficiência das operações laboratoriais. As Boas Práticas de Laboratório tratam da organização, do processo e das condições sob as quais estudos de laboratório são planejados, executados, monitorados, registrados e relatados.

Os equipamentos como os EPI's, jaleco, luvas, calçado fechado, óculos, máscara entre outros devem ser adequados a cada procedimento. Geladeiras do laboratório devem ser usadas apenas para armazenar amostras, soluções e reagentes, nunca para alimentos e equipamentos devem ser configurados regularmente e estar em locais apropriados.

Para profissionais envolvidos devem ter atenção especial à lavagem das mãos, cuidados com unhas, cabelos, barba e roupas, a fim de evitar contaminações cruzadas e devem ser devidamente treinados e informados e acidentes ocorridos devem ser documentados e avaliados para correções e prevenções.

Os procedimentos de limpezas dos laboratórios devem ser os mais rigorosos possíveis, sendo realizadas técnicas de desinfecção e o descarte de resíduos deve ser feito de maneira que não comprometa a saúde dos profissionais e do meio ambiente. A bancada de trabalho deve ser descontaminada ao final de cada turno de trabalho e sempre que ocorrer derramamento de agente biológico.

As técnicas assépticas em análises microbiológicas são procedimentos que devem ser adotados visando a não contaminação de materiais, meios e culturas, para obtenção de culturas puras. Para isso, devem-se preparar meios de cultura estéreis e conservá-los assim. Ao inocular os meios estéreis, deve-se ter o cuidado necessário para que não haja contaminação do meio externo.

Procedimentos empregados na esterilização de materiais para análise

Para um acondicionamento correto do material a ser usado em análises microbiológicas foi realizado um treinamento para este fim.

Após a secagem, a vidraria foi acondicionada corretamente em um papel resistente a autoclavagem para a esterilização a 121 °C por 15 a 20 minutos. Materiais sem tampas foram fechados com tampões de algodão hidrófobo e um invólucro de papel. As placas de Petri foram embrulhadas em papel em número de 6 por pacote. Nas pipetas foram colocadas buchas de algodão na extremidade de aspiração antes de acondicionar em papel (TIUMAN, 2018a).

As técnicas empregadas neste processo são necessárias para a proteção dos materiais utilizados contra a ação de agentes externos que podem causar danos ou contaminações.

O acondicionamento correto, com a devida esterilização, é imprescindível em laboratórios de microbiologia por isso é necessário produtos e materiais que estejam estéreis para garantir qualidade e resultados exatos.

Existem diversos métodos de esterilização, porém o objetivo principal constitui-se em exterminação das formas de vida microbiana, como bactéria, fungos, esporos e vírus. O método de esterilização pela autoclave é um tipo de esterilização física que utiliza vapor a altas temperaturas e é bastante utilizado nos laboratórios de microbiologia pela facilidade e viabilidade.

Preparo de meios de cultura e esterilização em autoclave

Para o cultivo de microrganismos, utilizam-se soluções e substâncias nutritivas chamadas meios de cultura, que devem atender às condições nutricionais de cada espécie a ser cultivada. Para isso foi realizado um treinamento para o preparo de meios de cultura. Foram pesados os ingredientes do meio de cultivo, em seguida foram dissolvidos em água destilada e agitados os componentes em um copo béquer no agitador magnético, até que fosse obtida a dissolução total dos constituintes no meio. Em seguida, os meios contendo ágar foram aquecidos em chapa aquecedora, agitando continuamente até a completa dissolução. A medida do pH foi realizado com fita. Foram distribuídos 5 mL dos meios de cultura nos tubos de ensaio com o auxílio de uma pipeta e depois foram fechados adequadamente e levados para autoclavar por 15 minutos em 121°C, fazendo o controle de esterilidade por 48 horas na estufa aquecida a 35°C. Por fim, foram armazenados em geladeira (TIUMAN, 2018b).

Existem alguns meios de cultura específicos para análises microbiológicas de controle de qualidade que seriam preparados, como por exemplo, o Ágar Dicloran Glicerol que é um meio base seletivo para favorecer um bom crescimento de leveduras e fungos (ANVISA, 2004). O Caldo Lauril Sulfato é um meio de cultivo para demonstração orientativa de coliformes e para enriquecimento seletivo deles, na análise de águas, alimentos e outros materiais. Devido sua elevada qualidade nutritiva e um tampão de fosfatos, garante-se o rápido crescimento e a intensa produção de gás, inclusive no caso de coliformes que fermentem lentamente a lactose (ACUMEDIA, 2010). Outro tipo de meio de cultura é o Caldo Verde Brilhante que é um caldo de enriquecimento seletivo e contagem de coliformes a partir de diversas amostras, também inibem totalmente o crescimento da flora acompanhante, inclusive clostrídios degradadores de lactose (PROBAC DO BRASIL, 2002). O Caldo EC é um meio de cultivo para demonstração seletiva de coliformes termotolerantes, que tem como principal representante da *Escherichia coli*, em águas, alimentos e outros materiais (PROBAC DO BRASIL, s.d.). Porém por conta do COVID-19 não houve a possibilidade da preparação desses meios para a análise microbiológica.

CONCLUSÃO

Foi possível realizar o estudo de normas de biossegurança e técnicas aplicadas em microbiologia, treinamento de procedimentos empregados na esterilização de materiais para análise microbiológica e treinamento para preparo de meios de cultura e esterilização em autoclave. Desta forma, alguns procedimentos e técnicas utilizadas no laboratório de microbiologia puderam ser estudados e vivenciados com a finalidade utilização correta nas análises microbiológicas de controle de qualidade de amostras de própolis.

AGRADECIMENTOS

À UTFPR, campus Toledo pela oportunidade e ao CNPq pela bolsa Iniciação Científica para o ensino médio.

REFERÊNCIAS

ACUMEDIA. Caldo lauril sulfato (7142). 2010. Disponível em: https://proficiency.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7142_pt_pi.pdf. Acesso em: 25 de julho de 2020.

ANVISA. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia/mod_4_2004.pdf

BANCADA PRONTA. A importância da escolha do melhor método de esterilização em laboratórios. Revista Veterinária, 2017. Disponível em: <https://www.revistaveterinaria.com.br/a-importancia-da-escolha-do-melhor-metodo-de-esterilizacao-em-laboratorios/>

BROGLIATO, C. Própolis: o que é, como usar e quais os benefícios, 2018. Disponível em: <https://www.ativo.com/nutricao/extrato-de-propolis-beneficios/>

LUSTOSA, S.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300020.

MARTINEZ, O. A.; SOARES, A. E. E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis, 2012. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-99402012000400006&script=sci_arttext

MORAES, P. L. Benefícios da própolis. Mundo Educação, 2019. Disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/curiosidades/beneficios-propolis.htm>

PENNA. P.M.M.; AQUINO, C.F.; CASTANHEIRA, D.D.; BRANDI, I.V.; CANGUSSU, A.S.R.; MACEDO SOBRINHO, E.; SARI, R.S.; DA SILVA, M.P.; MIGUEL, Â.S.M. Biossegurança: uma revisão. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.77, n.3, p.555-465, jul./set., 2010. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v77_3/penna.pdf

PORTAL DA CIDADE SANTA HELENA. Dia internacional da abelha: Coofamel é destaque na produção de mel na região, 2019. Disponível em: <https://santahelena.portaldacidade.com/noticias/cidade/dia-internacional-da-abelha-coofamel-e-destaque-na-producao-de-mel-na-regiao-3102>

PROBAC DO BRASIL. Caldo lactosado verde brilhante - bgbl 4%. São Paulo - SP. 2002. Disponível em: <http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Seletivos/Caldo%20Lactosado%20Verde%20Brilhante%20-%20Rev%202002.pdf>

PROBAC DO BRASIL. Meio para contagem de coliformes fecais caldo EC. São Paulo - SP. Disponível em:

<http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Isentos/Caldo%20EC%20-%20Rev00.pdf>. Acesso em 31 de agosto de 2020.

RICARDO, Paulo. O aquecido mercado de própolis no Brasil, 2019. Disponível em: <https://www.diariox.com.br/economia/o-aquecido-mercado-de-propolis-no-brasil/18875/>

TIUMAN, T. S. Aula 1 - Lavagem, secagem, acondicionamento e esterilização, de vidrarias. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Roteiro de aulas práticas, 2018a.

TIUMAN, T. S. Aula 2 - Preparação, acondicionamento e controle de qualidade dos meios de cultura. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Roteiro de aulas práticas, 2018b.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. Microbiologia. Grupo A. 2017. <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713549/>.