

Estudo do efeito antimicrobiano de diferentes concentrações de extrato de própolis.

Study of the antimicrobial effect of different propolis extract concentrations.

Emanuela Ferreira Torres¹, Alice Marqui de Carvalho¹, Jéssica Carius¹, Marcus Taveira²; Cecília Riscado Pombo³

¹Aluno de Graduação do Curso de Medicina Veterinária – UNIFESO; ²Técnico do Laboratório de Microbiologia do Campus Quinta do Paraíso – UNIFESO; ³Coordenadora do projeto e Professora do Curso de Medicina Veterinária – UNIFESO.

Resumo

Consumidores buscam qualidade e segurança nos alimentos. Assim, produtos que contenham conservantes naturais têm sido buscados. O extrato de própolis possui antimicrobianos naturais e seu efeito antimicrobiano foi estudado neste trabalho, com diferentes concentrações de extrato de própolis frente a diferentes cepas bacterianas de interesse em alimentos. A própolis utilizada para este estudo originou-se do Apiário Serrano localizado no município de Teresópolis e foram preparados, com esta, extratos etanólico a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% e um extrato aquoso. Cepas das espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e dos gêneros *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* foram ativadas para este estudo e utilizados nos antibiogramas. O extrato aquoso não inibiu o crescimento de nenhuma das cepas testadas e nenhum dos extratos etanólicos preparados e testados apresentou efeito antimicrobiano frente as cepas de *E. coli* e *Pseudomonas* sp. Dentre os extratos etanólico, somente os de concentração de 80 e 90% apresentaram algum efeito antimicrobiano sobre a cepas de *S. aureus*, *Klebsiella* sp. e *Proteus* sp.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Extrato de própolis; Conservante

Abstract

Consumers seek quality and safety in food. Thus, products containing natural preservatives have been searched. Propolis extract has natural antimicrobial compounds and its antimicrobial effect was studied in this work, using different propolis extract concentrations in antibiograms prepared with different bacterial strains of interest in food. The propolis used for this study came from a local apiary and with this were prepared ethanolic extracts (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90%) and an aqueous extract. Strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., and *Pseudomonas* sp. were activated for this study and used in antibiograms. The aqueous extract didn't inhibit any of the tested strains. None of the ethanol extracts showed antimicrobial effect across strains of *E. coli* and *Pseudomonas* sp.. Among the ethanolic extracts, only the concentration of 80 and 90% had some antimicrobial effect on strains of *S. aureus*, *Klebsiella* sp. and *Proteus* sp.

Keywords: Antimicrobial; Propolis extract; Preservative

INTRODUÇÃO

A preocupação com a alimentação saudável gera demanda importante para o consumo de produtos sem aditivos químicos artificiais. A exigência dos consumidores por produtos com alta qualidade revela a necessidade da utilização de tecnologias que propiciem segurança microbiológica e aumento de sua validade comercial, com o mínimo de alteração na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos.

A própolis é uma substância resinosa ou algumas vezes serosa, produzida por abelhas melíferas de diferentes exsudatos vegetais sendo um produto natural constituído de 55% resinas vegetais; 30% cera de abelhas; 8 a 10% de óleos essenciais e aproximadamente 5% de pólen.

Muitos trabalhos têm sido publicados expressando as propriedades biológicas da própolis, tais como: as atividades antimicrobianas, antifúngicas, antiprotzoária, antioxidante e antiviral. Tem sido sugerido que a atividade antibacteriana da própolis possa estar associada ao alto conteúdo de substâncias do tipo flavonóides (BIACHILI; BERBUDO, 1998) que podem ter suas concentrações variadas de acordo com a sazonalidade (CASTRO; CURY e ROSALEN, 2007).

Existe uma crescente preocupação do consumidor em fazer o uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível de produtos naturais. Um extrato que têm sido empregados há milhares de anos na medicina popular é o extrato de própolis, o qual tem sido utilizado para várias finalidades.

Vários produtos derivados de origem animal têm sido estudados utilizando-se o extrato de própolis pois contêm, naturalmente, substâncias antimicrobianas (BURDOCK, 1998; BIACHILI e BERBUDO, 1998; VARGAS, 2004; SILVA et al., 2006; CABRAL, 2008; BORGES, ALMEIDA e FRAGIORGE, 2009) sendo estudados como conservante natural em alimentos (QUEIROZ et al., 1996; BERNARDI, 2010; NEVES e LIMA, 2010).

Na Região Serrana do Rio possui apicultores que são produtores de própolis e

extrato de própolis. A utilização deste derivado como conservante de alimentos poderia ser um estímulo ao mercado interno deste produto, aumentando a variedade de produtos a serem oferecidos por estes produtores, agregando valor a sua produção.

Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes concentrações de extrato de própolis frente a diferentes cepas bacterianas de importância para a microbiologia de alimentos.

METODOLOGIA

A própolis utilizada para este estudo originou-se do Apiário Serrano localizado no município de Teresópolis. Foi adquirida uma embalagem contendo 50 g de própolis que foi encaminhada para o laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Curso de Veterinária da UNIFESO.

Preparo dos extratos etanólicos e aquoso de própolis

No laboratório, foram preparados os extratos de própolis baseados na metodologia estabelecida por PARK e colaboradores (1998).

A amostra de 50 g da própolis foi triturada e homogeneizada sendo transferidas para dez diferentes tubos de ensaio 2g da própolis em cada tubo. Em seguida, foram adicionados diferentes volumes de etanol P.A. e água destilada esterilizada para a formação dos extratos etanólico a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% e do extrato aquoso (Tabela 1). Em seguida, a extração com base alcoólica foi feita à 70°C em banho-maria por 30 minutos, sob agitação constante e a extração com base aquosa foi incubada por 2 horas a 95°C em banho-maria, sob agitação constante.

Tabela 1: Volumes de Etanol P.A. e água destilada esterilizadas adicionados para o preparo dos diferentes extratos de própolis estudados

Extrato de Própolis	Volume de Etanol P.A. (mL)	Volume de Água destilada esterilizada. (mL)
Extrato aquoso	-	25
10% etanol	2,5	22,5
20% etanol	5,0	20,0
30% etanol	7,5	17,5
40% etanol	10,0	15,0
50% etanol	12,5	12,5
60% etanol	15,0	10,0
70% etanol	17,5	7,5
80% etanol	20,0	5,0
90% etanol	22,5	2,5

Os extratos obtidos foram armazenados em tubos de ensaio com tampa de rosca, em refrigerador.

Ativação das cepas bacterianas

Cepas das espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e dos gêneros *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* foram ativadas para este estudo através da semeadura de caldo BHI (Brain and Heart Infusion) e incubados por 24 horas a 35 °C. Após este período, foi verificada a pureza dos caldos realizando esfregaço em lâmina seguido de coloração pela técnica de Gram para observação das características morfotintoriais das mesmas.

Preparo dos antibiogramas

Os antibiogramas foram realizados em meio Ágar Müller Hinton, preparado, esterilizado, plaqueado e mantido sob refrigeração até seu uso, como estabelecido por BRASIL (2003). Os discos de papel de filtro foram acondicionados em vidraria e posteriormente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

As cepas bacterianas foram semeadas nas placas através de zaragoas estéreis e os discos de papel de filtro foram submersos nos respectivos extratos de própolis para posterior posicionamento dos mesmo nas placas semeadas. Para cada cepa bacteriana foram

testados dez extratos, sendo colocado cinco discos por placa, totalizando duas placas para cada cepa. Os antibiogramas foram feitos em triplicata e sua incubação foi feita por 24 a 48 horas a 35°C.

RESULTADOS

Após o período de incubação, foram realizadas as leituras dos antibiogramas para verificação da sensibilidade das diferentes cepas frente aos extratos testados. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

O extrato aquoso não inibiu o crescimento de nenhuma das cepas testadas e nenhum dos extratos etanólicos preparados e testados apresentou efeito antimicrobiano frente as cepas de *E. coli* e *Pseudomonas* sp.

Dentre os extratos etanólico, somente os de concentração de 80 e 90% apresentaram algum efeito antimicrobiano sobre as cepas de *S. aureus*, *Klebsiella* sp. e *Proteus* sp.

O efeito antimicrobiano da concentração 80% pareceu ter sido mais eficiente uma vez que a sensibilidade ocorreu nas três repetições realizadas nos antibiogramas para *Klebsiella* sp. e em duas repetições para *Proteus* sp, não ocorrendo inibição do crescimento de *S.aureus*. O extrato etanólico de própolis a 90% promoveu inibição de crescimento bacteriano somente em uma repetição dos antibiogramas realizados para *S. aureus*, uma repetição para *Klebsiella* sp. e uma repetição para *Proteus* sp.

Tabela 2: Resultados, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento bacterianos das diferentes cepas e extratos de própolis testados feitos em triplicata

Extrato de Própolis	Zona de inibição do crescimento microbiano (mm)														
	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			<i>Klebsiella</i> sp.			<i>Proteus</i> sp.			<i>Pseudomonas</i> sp.		
Extrato aquoso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10% etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20% etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30% etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40% etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50% etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60% etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70% etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80% etanol	0	0	0	0	0	0	6,0	6,0	6,0	6,0	7,0	0	0	0	0
90% etanol	9,0	0	0	0	0	0	0	0	7,0	0	10,0	0	0	0	0

DISCUSSÃO

A não inibição do crescimento microbiano pode ter ocorrido em função do que foi relatado por Castro, Curi e Rosalen (2007), que afirmaram que existe uma variação da concentração dos compostos bioativos nas própolis em função da sazonalidade, interferindo, assim, na ação antimicrobiana dos extratos obtido.

Diferentemente do sugerido por Borges, Almeida e Fragiorge, (2009), que estudaram o efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de própolis em diferentes concentrações, os extratos obtidos no presente estudo não poderiam ser utilizados como conservantes de alimentos.

Ao contrário do estabelecido por Vargas e colaboradores (2004) as bactérias Gram negativas foram mais sensíveis ao efeito antimicrobiano dos extratos do que as bactérias Gram positivas.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que nenhum dos extratos preparados, tanto aquoso quanto etanólico, não foram eficientes para inibir o crescimento das cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp.

Somente os extratos com as concentrações de 80 e 90% de etanol apresentaram algum efeito inibitório no crescimento de *S. aureus*, *Klebsiella* sp. e *Proteus* sp.

O extrato aquoso não inibiu o crescimento bacteriano de nenhuma das cepas estudadas.

Este estudo gerou uma série de questionamentos com relação ao real efeito antimicrobiano dos extratos alcoólicos pois observou-se a inibição de crescimento justamente nas maiores concentrações alcoólicas dos extratos. Assim, percebeu-se que o efeito antimicrobiano pode ter ocorrido não em função das propriedades antimicrobianas da própolis e sim da propriedade antimicrobiana do etanol.

Sugere-se dar continuidade ao experimento para testar uma nova metodologia de extração alcoólica dos compostos com propriedade antimicrobiana da própolis porém, que seja permitida a evaporação do álcool para testar o real efeito dos extratos.

REFERÊNCIAS

1. BERNARDI, S. Funcionalidade de própolis livre e microencapsulada em salame tipo italiano. 2010. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba; 2010. 127 p.
2. BIACHINII, L.; BERBUDO, I.P. Efeito Antibiótico do Própolis sobre Bactérias Fitopatogênicas. Sociedade agrícola, v.55, v.1, 1998.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água, Brasília, DF, 2003.
4. BORGES, C. H. F.; ALMEIDA, D. A.; FRAGIORGE; E. J.. Atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes concentrações de extratos hidroalcoólicos de própolis (ehp) em lingüiça frescal suína. FAZU em Revista, n.6, p.53-82, 2009.
5. BURDOCK G. A.. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chemical Toxicology., v.36, n.4, p.347-63, 1998.
6. CABRAL. I. S. R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antimicrobiana da própolis vermelha brasileira. 2008. 94f. Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.

7. CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química. Nova*, Vol. 30, No. 7, 1512-1516, 2007.
8. NEVES, M. V. M.; LIMA, V. L. A. G. Avaliação sensorial e caracterização físico – química de néctar de acerola adicionado de extrato comercial de própolis. *Alim. Nutr, Araraquara*, v. 21, n. 3, p. 399-405, jul./set. 2010.
9. PARK, Y. K; IKEGAKI, M; ABREU, J. A. daS.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc. Tecnol. Aliment. vol. 18 n. 3* Campinas Aug./Oct. 1998.
10. QUEIROZ, M.I.; BADIALE-FURLONG, E.; COELHO, C. S. P.; ZÍLIO, R. L.; CORREA, A. C. Avaliação do comportamento da oxidação de carne de pescado salgado tratado com própolis. *B CEPPA*, v.14, n.2, p.273-80, 1996.
11. SILVA, J. F. M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S.R, ANDRADE MR, VIDAL FVN Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry.*, v.99, p.431-435, 2006.
12. VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N. M. da; COSTA, M. M.; SÁ, E.; SILVA, M.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, v.34, p.159-163, 2004.

Contato:

Nome: Cecília Riscado Pombo

e-mail: cissapombo@yahoo.com.br