

PRÓPOLIS: FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

FRANCIELLE MACIEL ZURSCHIMITTEM¹; CRISTINA JANSEN²; KARINA FERNANDES¹; ELIEZER AVILA GANDRA³; RUI CARLOS ZAMBIAZI³

¹Discentes do curso de Bacharelado em Química de Alimentos - UFPEL -
franciellezurschimittem@hotmail.com; karinaffernands@gmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFPEL -
cris-jansen@hotmail.com

³Docentes do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos - UFPEL -
zambiaz@gmail.com; gandraea@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Própolis é um produto elaborado pelas abelhas através de substâncias resinosas e gomosas, que são coletadas de brotos, flores e exsudados de plantas. As abelhas digerem parcialmente estes materiais através da ação das enzimas contidas nas suas secreções salivares, e após acrescentam ainda cera e pólen, formando assim a própolis (BRASIL, 2001; SILVA et al., 2012).

A composição química da própolis é dependente da biodiversidade da região visitada pelas abelhas. Portanto, as substâncias presentes encontram-se diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem (CASTRO et al., 2007).

A própolis vem sendo utilizada desde as civilizações antigas no tratamento de diversas doenças, devido as suas propriedades biológicas e terapêuticas (CARDOSO et al., 2010). Propriedades, como a antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante, são atribuídas à complexa composição química, principalmente pela presença de fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas, incluindo majoritariamente os compostos fenólicos (SILVA et al., 2012, FROZZA et al., 2013).

Pesquisas tornam-se fundamentais para caracterizarem a própolis de diferentes microrregiões brasileiras, distinguindo a composição e a atividade biológica das amostras, e assim, sua melhor aplicação.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização química de amostras de própolis oriundas da região Sul do Rio Grande do Sul, determinando os de compostos fenólicos e sua ação antibacteriana.

2. METODOLOGIA

Cinco amostras de própolis foram coletadas por apicultores na primavera, entre os meses de setembro a novembro de 2013, a partir de cidades da região Sul do Estado do Rio Grande do Sul: Pelotas 1 (31°42'10.3"S e 52°22'34.9"W) e Pelotas 2 (31°35'55.0"S e 52°31'06.0"W); Rio Grande (32°02'06.2"S e 52°05'56.4"W); Canguçu (31°23'33.8"S e 52°39'58.8"W); e Pedro Osório, Zona Rural (31°52'37.4"S e 53°01'25.2"W).

Após a remoção das principais impurezas visíveis, a própolis foi pesada, acondicionada em embalagens plásticas e congeladas (-20°C) até o momento das análises. Para cada amostra foram realizadas três repetições.

2.1. Preparação dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP)

Inicialmente as amostras de própolis bruta foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido. Após preparou-se os extratos de acordo com Silva et al. (2012), para obtenção de um extrato a 10% (1:10 m/v). O sobrenadante foi removido e centrifugado a 150rpm a 5°C por 15 minutos.

2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos

Para a determinação do total de compostos fenólicos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (ALVES, KUBOTA, 2013). As amostras foram diluídas na proporção de 1:10, com etanol 80%. Desta solução 500 µL foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N, e após foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após a incubação por 2 horas, a absorbância foi medida a 725 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis).

O ácido gálico nas concentrações de 30 a 500 µg.mL⁻¹ foi utilizado para a curva de calibração $y = 0,0109x - 0,0573$ e $R^2 = 0,9982$.

2.3. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009). Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 2913 e *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895. As cepas foram reativadas em Caldo BHI com incubação a 37°C por 24h, após as cepas foram transferidas para placas de Ágar BHI. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram resuspendidas em uma solução de NaCl 0,89% estéril, e a concentração do inóculo foi ajustada em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) para corresponder à 0,5 da escala Mc Farland, o que equivale entre $1-2 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹. Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas foi inoculado em 30 mL do caldo BHI, para se obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. A técnica foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de caldo BHI previamente inoculado. Em seguida, foram adicionados 100 µL do EHP em concentrações que variaram de 0,1-12 mg/mL (diluição seriada de razão 2). Como controle negativo foi utilizado o etanol 80% (v/v). As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, foram adicionados 30 µL do corante Resazurina (0,01%; m/v) para verificar os poços em que houve crescimento bacteriano. Após 3 h de incubação, nos poços em que não houve mudança na cor do corante, ou seja, permaneceu roxo, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração se considerou crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM, alíquotas de 10 µL do meio de cultura dos poços considerados com efeito inibitório foram semeadas em placas de Petri com ágar BHI e incubados a 37°C/24 h. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de compostos fenólicos (tabela 1) mostra que as amostras oriundas de Rio Grande e de Pelotas 2 apresentaram valores superiores as demais, diferindo significativamente, apresentando teores três vezes superiores aos encontrados para as amostras de Pedro Osório e Canguçu.

Tabela 1. Teor total e percentual de compostos fenólicos de extratos de própolis oriundos de diferentes cidades do RS.

Amostras	Compostos Fenólicos	
	mg EAG.g ⁻¹	%
Canguçu	56,92 c	1,39 c
P. Osório	60,08 c	1,24 c
Pelotas	122,52 b	3,43 b
Pelotas 2	189,81 a	3,57 a
Rio Grande	200,39 a	3,68 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). %-percentagem de compostos fenólicos sobre a própolis bruta (m/m).

As amostras de própolis oriundas de Pelotas diferiram entre si, demonstrando que existe variação na composição química da própolis mesmo em amostras coletadas na mesma cidade.

De acordo com a normativa 03, de 19 de Janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2001), os extratos de própolis devem conter, no mínimo, 0,50% de compostos fenólicos. O teor de compostos fenólicos para os extratos hidroalcoólicos de própolis oriunda de Pelotas, Canguçu, Rio Grande e Pedro Osório foi de 3,43%; 3,57%; 1,39%; 3,68% e 1,24%, respectivamente. Portanto, todas as amostras estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação.

De fato, os dados encontrados sugerem que a própolis de diferentes localidades apresentam diferentes conteúdos de compostos fenólicos, o que pode ser resultante dos diferentes métodos de extração, além da localização geográfica, a origem botânica das plantas, às grandes distâncias entre o local de origem e as diferentes práticas apícolas (FROZZA et al., 2013).

Os resultados para a atividade antimicrobiana das amostras estão expostos na tabela 2. Todas as amostras de própolis testadas apresentaram atividade antibacteriana, porém os resultados variaram de acordo com concentração e com a origem da amostra.

No geral, todas as amostras apresentaram valores inferiores para *S. Aureus*, e bem superiores para a *E. coli*, única bactéria Gram-negativa testada; portanto, foram menos efetivas contra esta bactéria.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de extratos hidroalcoólicos de própolis de cidades do Sul do RS frente a bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

AMOSTRAS	<i>S. aureus</i>		<i>E. Coli</i>	
	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)
Canguçu	0,53 aB	3,13 bB	6,25 aA	12,50 aA
P. Osório	0,2 aC	6,25 aB	6,26 aA	12,50 aA
Pelotas	0,1 aA	1,25 cB	1,56 cA	1,56 cA
Pelotas 2	0,43 aA	1,25 cB	1,31 cA	1,56 cA
Rio Grande	0,2 aB	1,56 dB	3,13 bA	3,13 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As amostras de própolis oriundas de Rio Grande e de Pelotas foram mais eficazes em todas as bactérias testadas.

E. coli apresentou maior resistência ao extrato de própolis, sendo que sua CIM e CBM foram superiores as necessárias para *S. aureus*. O estudo de Júnior et al. (2006) avaliaram o efeito antimicrobiano frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas de extrato metanólico de própolis (EMP) dos estados de SP, SC e RN, e constataram que a CIM variou de acordo com a região de produção da própolis, sendo que as bactérias Gram positivas foram mais suscetíveis ao EMP, independente do local, o que corrobora com o resultado obtido neste trabalho.

Acredita-se que os compostos fenólicos presentes na própolis atuem na parede celular destas bactérias, e como as Gram-negativas possuem estrutura quimicamente mais complexa, apresentando a membrana externa, reduz a efetividade desses compostos, pois promovem uma barreira à permeabilidade de substâncias hidrofóbicas, e são os responsáveis pela antigenicidade, toxicidade e patogenicidade das Gram negativas, o que as tornam mais resistentes à ação da própolis do que as bactérias Gram-positivas (FOX, 2010).

No geral, as amostras de Pelotas e Rio Grande apresentam os melhores resultados para a atividade antibacteriana, havendo uma associação entre a concentração de compostos fenólicos e atividade antibacteriana, ou seja, quanto maior o teor de compostos fenólicos, maior a ação antibacteriana.

4. CONCLUSÕES

De acordo com o presente trabalho, pode-se concluir que quanto aos compostos fenólicos, as amostras apresentaram alto teor de compostos fenólicos em extratos alcoólicos de amostras de própolis do Sul do Rio Grande do Sul, principalmente da própolis oriunda da cidade de Pelotas e de Rio Grande.

Quanto à atividade antibacteriana, todos os extratos das amostras de própolis foram eficazes na inibição das bactérias testadas, apresentando atividade bacteriostática e bactericida. Porém, os resultados foram melhores na inibição da bactéria Gram-positiva (*S. aureus*).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União** de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.
- CABRAL I. S. R.; OLDONI T. L. C.; PRADO A.; BEZERRA R. M. N.; ALENCAR S. M.; IKEGAKI M.; ROSALEN P. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-27, 2009.
- CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. C. de. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 432–434, 2010.
- CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; KOO, H.; DUARTE, S. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.
- FOX, A. **Microbiologia e Imunologia On line**. Bacteriologia – capítulo quarto: Membrana celular, esporos e biossíntese macromolecular. 2010. Disponível em: <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/chapter_4_bp.htm>. Acesso em: jan. 2015.
- FROZZA, C. O. da S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O. de; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; PÉGAS, J. A.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, 2013.
- JÚNIOR, A. F.; LOPES, M. M. R. ; COLOMBARI, V. ; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, 2006.
- SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.