



# FICE

4ª FEIRA DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA E EXTENSÃO

15 e 16 de Setembro

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA PRÓPOLIS DE ABELHAS NATIVAS: *T. angústula* e *M. quadrifasciata quadrifasciata*

Júlia Mioza Lazaris<sup>1</sup>; Marina Frâncio Balena<sup>2</sup>; Karine Schulck<sup>3</sup>; Aledson R. Torres<sup>4</sup>; Bruno Menezes de Oliveira<sup>5</sup>

### INTRODUÇÃO

Introduzidas no Brasil, em 1839 pelo padre Antônio Carneiro, as abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera caucasica*) disseminaram-se por toda a Federação. Sendo que, devido a sua superioridade as abelhas europeias, posteriormente africanizadas, assumiram um papel predominante sobre as demais espécies nativas (NOGUEIRA-NETO, 1997; SOARES, 2012). Mas há também mais de uma centena de espécies de abelhas nativas, também conhecidas como abelhas indígenas, que já existiam no Brasil antes da introdução da *Apis mellifera*, que também produzem mel e própolis. Essas abelhas são polinizadoras naturais de inúmeras plantas da flora brasileira que ajudam a manter a biodiversidade.

Atualmente a procura por produtos naturais com aplicação biológica tornou-se de grande interesse da comunidade científica, e não diferentemente, ocorreu com os produtos produzidos pelas abelhas: mel, própolis, cera, pólen. O própolis constitui-

1-Aluna do IFC-Videira, Curso Téc. Nível Médio Int. em Agropecuária. E-mail: julialazaris@gmail.com

2-Aluna do IFC-Videira, Curso Téc. Nível Médio Int. em Agropecuária. E-mail: marinabalena@gmail.com

3-Técnica de Laboratório de Química do IFC-Videira. E-mail: karine.schuck@ifc-videira.edu.br

4-Professor Coorientador do IFC-Videira. E-mail: aledson.torres@ifc-videira.edu.br

5-Professor Orientador do IFC-Videira. E-mail: bruno.oliveira@ifc-videira.edu.br



**O presente trabalho foi realizado com o apoio  
do Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil**



# FICE

4ª FEIRA DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA E EXTENSÃO

15 e 16 de Setembro

se de uma resina produzida pelas abelhas, oriunda da mistura de secreções produzidas pelas abelhas e de diferentes partes de plantas, como brotos, botões florais e exsudados resinosos (GHISALBERTI, 1979).

A este produto apícola tem sido creditado inúmeras atividades biológicas, podendo citar atividades antimicrobianas, anti-inflamatória, anti-sépticas entre outras que tem atraído a atenção de pesquisadores (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA *et al.*, 1995; MARCUCCI, 1995). Sua composição química está diretamente relacionada com a flora da região, época da colheita, técnica empregada para extração e com a espécie da abelha (MARCUCI, 1995). Várias são as classes de substâncias isoladas, identificadas e quantificadas na própolis, as quais citamos: flavonoides, flavonas preniladas, benzopirano, benzofenona, éster do ácido caféico, triterpenóides entre outros (CHEN *et al.*, 2003; RUBIO *et al.*, 1999; BANSKOTA *et al.*, 2000). Dentre estes destacam-se os flavonóides e ácidos fenólicos aos quais são atribuídas grande parte das atividades biológicas da própolis.

Embora as indústrias farmacêuticas tenham produzido uma variedade de antibióticos, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência das bactérias a essas drogas usadas para fins terapêuticos. Em geral, bactérias têm a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. O problema dos microrganismos resistentes está crescendo e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida (COUTINHO *et al.*, 2004). Sendo assim, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais com potencial terapêuticos e principalmente com atividade antibiótica devem ser estimuladas no intuito de criar novas perspectivas de tratamentos contra esses patógenos. De forma que propomos no presente estudo a avaliação da concentração inibitória mínima da própolis das espécies de abelhas nativas: *T. angústula* e *M. quadrifasciata*, contra bactérias das espécies *E. coli* e *S. Aureus*; o que se torna importante no momento que poucos estudos tem sido realizados sobre as propriedades do própolis destas abelhas.



# FICE

4ª FEIRA DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA E EXTENSÃO

15 e 16 de Setembro

## PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Química do Instituto Federal Catarinense câmpus Videira, no período de julho de 2014 a julho de 2015. Para o experimento foram utilizados os própolis produzidos por 2 espécies de abelhas nativas sendo elas: *Tetragonisca angustula* (Jataí), *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* (Mandaçaia).

### Coleta das amostras e obtenção do extrato

O própolis foi coletado no meliponário de propriedade do Sr. Luiz Celso Stefaniak, localizada no interior de Rio das Antas - SC (latitude 26°51'13,8" Sul, longitude 51°05'40,4" Oeste). As coletas foram realizadas na primavera de 2014, sendo realizadas através de raspagem mecânica das caixas.

A obtenção do extrato etanólico do própolis (EEP) foi conforme descrito por PARK et al.(1998), onde o própolis após colhido foi triturado com uso de pistilo e gral, e após triturado, 2 g de própolis foram adicionado a 25 mL de solução hidroalcoólica (80%), sendo a extração realizada a 70 °C por 30 minutos , com agitação constante.

### Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através do método de microdiluição em caldo, conforme descrito pela Clinica and Laboratory Standards Institute - CLSI M07-A09 (2012) com pequenas modificações. As cepas bacterianas de *S. aureus* (ATCC25923), *E. coli* (ATCC25922) foram cultivadas em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) em microplacas contendo 96 poços. O inócuo bacteriano foi ajustado a partir da escala 0.5 MacFarland ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) para obter concentração final no poço de  $5 \times 10^5$  CFU/mL. A concentração final do extrato variou entre 16- 0,25 mg/mL. A inócuo bacteriano deixado em crescimento por 24 h a 37 °C, quando então foi adicionado 40 µL de Resazurina 0,01% (indicador de crescimento) e após 30 minutos realizou-se a leitura visual. O desenvolvimento de cor roxa indica

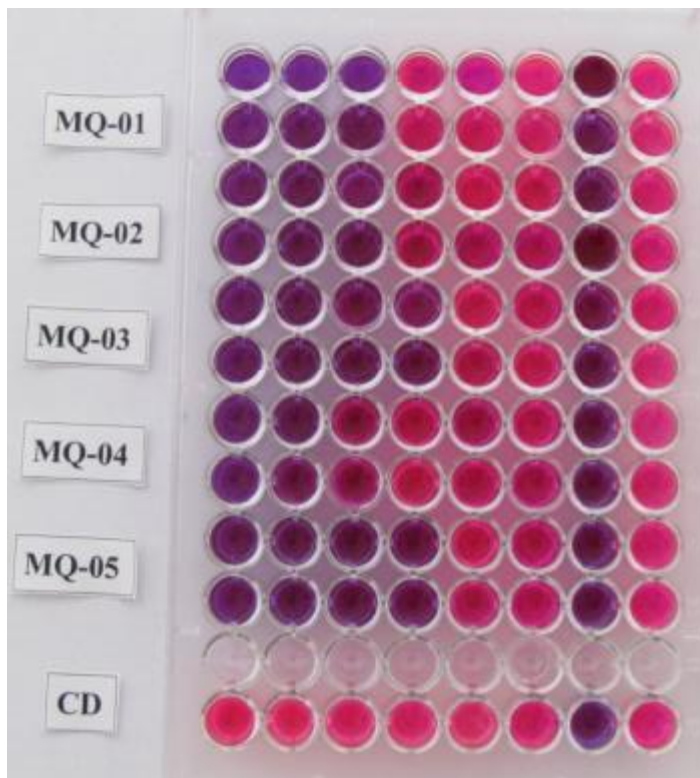


que não houve crescimento bacteriano (negativo), enquanto que a cor púrpura indica crescimento (positivo).

**Quadro 1 – Esquema da microdiluição em caldo**

Primeira etapa: Adicionar o meio puro (para diluição seriada) Adicionar o Meio + EEP ( $T_{zero}$ )				Fora/esgoto		
				Cont Neg	Cont Pos	
				11	12	
A	100 Meio 8 mg/mL	100 Meio 4 mg/mL	100 Meio 2 mg/mL	100 Meio 1 mg/mL	200 Meio	100 Meio
Segunda etapa: Adicionar 100 $\mu$ L do $T_{bact}$ (menos no Cont. Neg.)				Cont Neg		Cont Pos
A	100 $T_{bact}$ 4 mg/mL	100 $T_{bact}$ 2 mg/mL	100 $T_{bact}$ 1 mg/mL	100 $T_{bact}$ 0,5 mg/mL		100 $T_{bact}$

**Fig. 1 – Exemplo do ensaio da microdiluição**





# FICE

4ª FEIRA DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA E EXTENSÃO

15 e 16 de Setembro

## Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da aplicação do teste t, utilizando para isso o programa Graph Pad Prism versão 4.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

De acordo com as análises realizadas, observamos que o EEP apresentou atividade antimicrobiana para ambas as cepas bacterianas testadas: *S. aureus* (ATCC25923), *E. coli* (ATCC25922), sendo que a menor CIM, ou seja, maior atividade antibacteriana foi contra a bactéria gram positiva, o que encontra-se de acordo com a literatura (SILVA *et al.*, 2012; Da CUNHA *et al.*, 2013; CHOUDHARI *et al.*, 2012; FERNANDES Jr. *et al.*, 2001; MARCUCCI *et al.*, 2001).

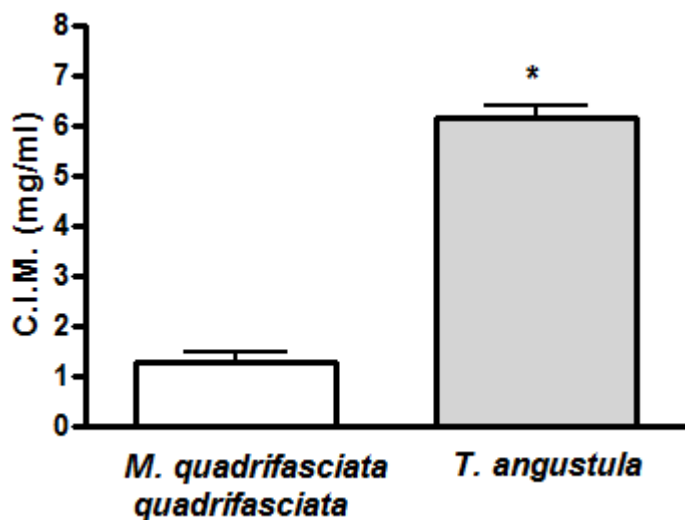
**Tabela 1. Suceptibilidade da *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *T. angustula* ao EEP**

Cepa Bacteriana		<i>M. quadrifasciata quadrifasciata</i>	<i>T. angustula</i>
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	1.26 mg/ml	6.13 mg/ml
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	7.72 mg/ml	9.73 mg/ml

O EEP da *M. quadrifasciata quadrifasciata* apresentou uma melhor atividade antibacteriana que a *T. angustula* para ambas as bactérias. A CIM do EEP da *M. quadrifasciata quadrifasciata* foi de 1,26 e 7,72 mg/mL, contra *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente (Fig. 2).

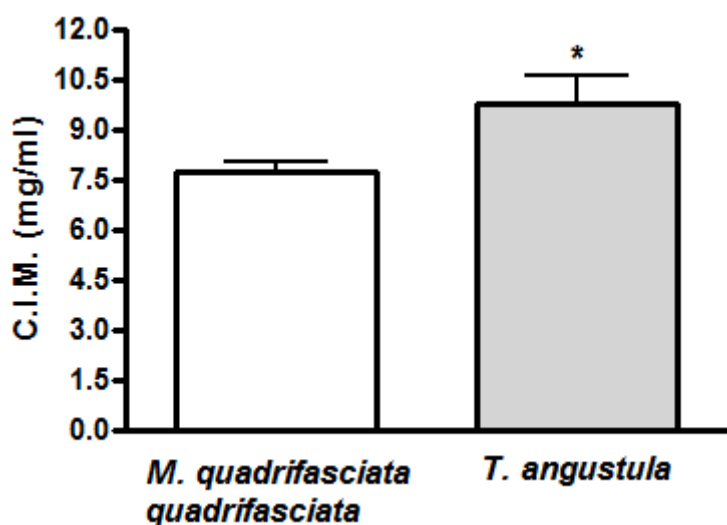


Figura 2 - Determinação da CIM do EEP para *S. aureus*



O EEP da *T. angústula* apresentou maior CIM, 6,13 mg/mL para *S. aureus* e 9,73 mg/mL para *E. coli*. (fig. 3)

Figura 3 – Determinação da CIM do EEP para *E. coli*





# FICE

4ª FEIRA DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA E EXTENSÃO

15 e 16 de Setembro

Os valores para CIM encontrados neste trabalho com abelhas nativas sem ferrão (meliponíneos) são maiores quando comparados aos valores publicados para abelhas da espécie *Apis mellífera*, o que encontra-se de acordo com o descrito por Levy Jr. (1997) e Fernandes Jr. (2001). O que pode ser atribuído a diferença na composição química da própolis entre as espécies produtoras, uma vez que existe uma preferência das espécies de abelhas por determinadas espécies florais, sendo que a especificidade da flora determina a composição da própolis (BANKOVA *et al.* 2014).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos avanços na terapia, ainda vivemos em uma era onde os incidentes de infecções resistentes a antibióticos estão assustadoramente em ascensão. O fator mais importante que influencia o surgimento e disseminação da resistência aos antibióticos é a excessiva exposição bacteriana aos antibióticos. Onde surge a necessidade de pesquisar produtos de origem natural com atividade antibacteriana. O EEP de *M. quadrifasciata quadrifasciata*, demonstrou boa atividade antibacteriana para *S. aureus*, podendo ser usado como coadjuvante ao tratamento usual clínico convencional.

## REFERÊNCIAS

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**. n. 31, p. 3-15, 2000

BANKOVA, V. S.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds; chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**. n. 8:28, p. 1-8, 2014.



# FICE

4ª FEIRA DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA E EXTENSÃO

15 e 16 de Setembro

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y; MIDORIKAWA, K; MATSUSHIGE, K; KADOTA, S. **Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. Journal Nat. Prod.**, v. 63, p.1277-9, 2000

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J. K.; J. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. **Journal Natural Products**, n. 66, v. 4, p.503-6, Apr, 2003.

CHOUDHARI, M. K.; PUNEKAR, S.A.; RANADE, R. V.; PAKNIKAR, K.M. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona sp.*) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 363-367, 2012

COUTINHO et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Revista Conceitos** v. 6, p. 77-85, 2004.

Da Cunha, M. G.; Franchin, M.; de Carvalho Galvao, L. C.; de Ruiz, A. L.; de Carvalho, J. E.; Ikegaki, M.; de Alencar, S. M.; Koo, H.; Rosalen, P. L. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13:23. 2013.

FERNADES JR, A.; LEOMIL, L.; FERNADES, A. A. H.; SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of própolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of venomous Animals and Toxins**, v. 7 (2), p. 1-9, 2001

GHISALBERTI, E. L. Própolis: a review, **Bee World**. v. 60, p. 59-84, 1979  
LEVY JR NC. **Estudo da atividade antimicrobiana de méis e própolis de *Apis mellifera* e *Meliponinae* brasileiros**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 1997. 116p. (Dissertação - Mestrado).

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties an therapeutic activity. **Apidologie**. v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. d., DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian própolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p 105-112, 2001

NCCLS; **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard - M7-A09**, vol. 32, nº 02, 2012.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**, São Paulo, ed. Nogueirapis, 1997



# FICE

4ª FEIRA DE INICIAÇÃO  
CIENTÍFICA E EXTENSÃO

15 e 16 de Setembro

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência Tecnologia de Alimentos**. n. 18, v. 3, p. 313-318, 1998.

RUBIO, O. C.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N.; CASTRO, H. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. Polyisoprenylated benzophenones from Cuban propolis. **Journal Natural Products**. v. 62, p. 1013-1015, 1999.

SILVA, J.C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X. ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, nº50, p.1790-1795, 2012.

#### APOIO:



O presente trabalho foi realizado com o apoio  
do Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil