

Hill Book Company, 1940.

¹⁵ Kraus, J.; Arduin, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. EDUR, Seropédica, RJ, 1997.

***Autor para correspondência:**

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze Gutierrez
Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Biologia
Av. Colombo, n. 5790 - CEP 87020-900 - Maringá - PR
E-mail: milaneze@uem.br

Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana

Dos Santos, C.R.; Arcenio, F., Carvalho, E.S.; Lúcio, E.M.R.A., Araújo, G.L.; Teixeira, L.A.; Sharapin, N.; Rocha, L.*

Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense.

Resumo

A própolis, também conhecida como "cola de abelhas" possui atividade antimicrobiana, antiinflamatória, anestésica e imunoestimulante. Amostras de diferentes origens geográficas podem apresentar composição química bem diferente, porém continuam sendo responsáveis por atividade antibacteriana, inclusive contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Este trabalho teve por objetivo otimizar o processo de extração visando determinar a melhor alcoolatura para a obtenção de tinturas de própolis com maior atividade antimicrobiana. Amostras de própolis foram extraídas com diferentes misturas hidroalcoólicas, variando o teor de etanol entre 90% a água pura, obtendo assim 11 tinturas diferentes. Todas as tinturas foram aplicadas em discos de papel, secos e colocados sobre a superfície de placas contendo ágar inoculado com cepa multirresistente de *S. aureus*. As placas foram incubadas e avaliadas no dia seguinte quanto à presença de halos de inibição. Os melhores resultados foram obtidos com extratos contendo 50 a 90% de etanol. O trabalho sugere a utilização da alcoolatura de 70% como a ideal para a obtenção de tinturas de própolis.

Abstract

Bee glue (propolis) possesses antimicrobial, anti-inflammatory, anaesthetic and immunostimulating activities. Propolis composition is extraordinary variable; samples from different geographic origin may possess entirely different chemical composition. In different propolis samples, various substance combinations are responsible for the antibacterial activity of the bee glue. The aim of the study was to evaluate the best ethanolic extract concentration using *Staphylococcus aureus* multiresistant. Ethanol extracts from different concentration (10 to 90%) were applied on paper disks, dried, and put on the surface of nutrient agar plates with the overlay containing *S. aureus*. The plates were then incubated and evaluated the next day for the presence of inhibition zones. The best result was verified among 60 to 90% of ethanolic extract of propolis. This paper suggests the use of the alcohol 70% as the ideal for the extraction of propolis.

Própolis, conhecida como "cola das abelhas"¹, é o produto final de uma mistura de gomas, resinas e bálsamos de diversas fontes vegetais, coletados e processados por abelhas

melíferas². O uso da própolis pelo homem é muito antigo talvez pelo fato desta mistura apresentar diferentes atividades destacando-se a antibacteriana, a antifúngica, a antiviral, a antiinflamatória, citostática e imunestimulante como as mais conhecidas³. Além disso, sabe-se que apesar deste produto poder apresentar algumas reações alérgicas, ele é relativamente não tóxico⁴.

A composição química da própolis não é constante, pois varia de acordo com a flora usada para a sua elaboração, com o período de coleta e com a variedade das abelha^{2,5,6}. Entretanto, os principais grupos químicos encontrados são flavonóides, como a galangina, quercetina, pinocebrina e kaempferol⁷, além de terpenóides e fenilpropanóides como os ácidos cafeico e clorogênico^{8,9}. Muito embora alguns trabalhos científicos tenham sido realizados demonstrando o potencial antimicrobiano da própolis^{3,10,11}, as substâncias responsáveis por essa atividade ainda não foram descritas em sua totalidade, pois podem variar de uma amostra para outra. Tabera e colaboradores observaram diferenças no poder antibacteriano da própolis de diferentes regiões da Argentina quando testadas frente a *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina¹⁰. Própolis provenientes de diferentes regiões e climas da Alemanha e do Egito demonstraram alta atividade contra *Staphylococcus aureus*¹². Já a atividade de própolis provenientes da Mongólia, Alemanha e Egito foi verificada contra bactérias Gram negativas utilizando para tal cepas de *Escherichia coli*¹³. Neste mesmo estudo, também se observou a atividade antifúngica da própolis do Egito e da Austrália utilizando *Candida albicans*¹³. Recentemente, a atividade da própolis foi demonstrada contra 38 cepas clínicas de *Helicobacter pylori* e 18 de *Campylobacter* spp¹⁴.

Por outro lado, Fierro demonstrou que pacientes com feridas superinfetadas, quando tratados localmente com própolis e um antibiótico sistêmico, apresentavam melhor evolução que os pacientes tratados apenas com o antibiótico¹⁵. Além disso, o uso de própolis em solução alcoólica também vem demonstrando a sua alta atividade contra bactérias Gram-positivas e ação considerável contra bactérias Gram-negativas e fungos em forma de leveduras^{11,14,16}. A alcoolatura das tinturas de própolis pode ser um fator importante e determinante para a eficácia como antimicrobiano, a qual ainda não foi padronizada. Assim, pelo fato da literatura apresentar grande quantidade de informações com relação às atividades biológicas da própolis, principalmente com relação à atividade antibiótica, o objetivo desse trabalho foi a otimização do processo extrativo da própolis utilizando avaliação comparativa da atividade antibacteriana da própolis extraída em diferentes alcoolaturas.

Os valores dos halos de inibição encontrados para tinturas de própolis preparadas com diferentes alcoolaturas estão descritos na tabela 1. As tinturas de própolis que apresentaram maior atividade foram àquelas obtidas em alcoolaturas de 50 a 90%, enquanto que tinturas obtidas com alcoolaturas menores apresentaram menor atividade. Tais resultados poderiam ser questionados, uma vez que, por séculos os álcoois têm sido apreciados por suas propriedades antimicrobianas. Para não deixar dúvida que a atividade antibacteriana devia-se

exclusivamente à própolis, os discos impregnados com extratos em diferentes alcoolaturas foram deixados, de maneira asséptica, em estufa a 37 °C, afim de que todo o álcool presente nos discos evaporasse antes de ser adicionado ao meio de cultura. Com este cuidado, ficou claro que a atividade antimicrobiana apresentada foi exclusivamente devido à própolis. Apesar dos valores obtidos dos halos de inibição terem sido inferiores ao da vancomicina, os resultados foram significativos, considerando a resistência da cepa bacteriana utilizada neste experimento. Além disso, como foi demonstrado por Boyanova e colaboradores, a técnica de impregnação em discos apresenta halo de inibição menor do que quando cilindros são utilizados¹⁴.

O controle de qualidade da própolis fundamentado somente na análise química é dificultado em função da variabilidade de sua composição química. Através da técnica de impregnação de discos, foi possível obter um perfil da atividade antimicrobiana da própolis em diferentes alcoolaturas. De acordo com os resultados (tabela 1), as melhores atividades encontradas para a própolis foram para as alcoolaturas entre 50 e 90%. Sendo assim sugere-se proceder à extração da própolis utilizando-se alcoolatura de 70%, pois além de ser um valor intermediário da faixa encontrada, pode potencializar o seu efeito antimicrobiano, visto que, muito embora ainda não se saiba o exato mecanismo pelo qual o álcool destrói os microrganismos¹⁸, há muito tempo é conhecido que a eficácia antimicrobiana do álcool na presença da água é aumentada nas concentrações próximas a 70% (v/v)¹⁹.

Materiais e Métodos

Origem das amostras

Própolis: No ensaio visando a determinação da melhor alcoolatura para obtenção dos extratos, foi utilizada uma amostra de própolis de tela proveniente da cidade de Pirassununga-SP.

Bactéria: Uma cepa de *Staphylococcus aureus* multirresistente pertencente ao clone epidêmico brasileiro foi utilizada neste estudo¹⁷. Esta bactéria foi gentilmente cedida pelo laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (IMPPG - UFRJ) onde o seu perfil de sensibilidade foi determinado, apresentando resistência à maioria dos antibióticos utilizados na prática clínica, sendo sensível apenas a vancomicina.

Preparação das tinturas de própolis em diferentes alcoolaturas:

As tinturas de própolis foram obtidas a partir da extração de 10 g da amostra de própolis com 100ml de mistura de etanol e água em diferentes alcoolaturas, sendo, respectivamente: etanol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% e água. As 11 misturas foram deixadas sob maceração dinâmica durante 14 dias sendo ao final submetidos à filtração.

Determinação da atividade antimicrobiana das diversas tinturas de própolis obtidas:

A eficácia antimicrobiana das extrações foi testada utilizando-se as tinturas obtidas com diferentes alcoolaturas frente à amostra bacteriana. Esta análise foi realizada pelo método de impregnação de discos de papel de filtro com 5 mm de diâmetro²⁰. Para tal, 40 µl de cada tintura foram aplicados nos discos de papel e deixados em estufa para que o álcool fosse evaporado e não interferisse no teste. Discos de papel de filtro impregnados apenas com etanol foram também submetidos

ao mesmo tratamento e utilizados como controle. O inóculo bacteriano foi obtido de acordo com as recomendações do NCCLS (NCCLS, 1993), utilizando-se a escala 0,5 de Mac Farland para se obter uma suspensão com aproximadamente 10^8 UFC/ml. Com uma zaragatoa, a suspensão bacteriana foi semeada de maneira confluyente em placas de Petri contendo 20 ml do meio de cultura Agar Müller-Hinton. Depois de secos, os discos foram depositados na superfície do meio de cultura e então incubados em estufa a 37 °C por 24 h. Discos controles contendo vancomicina (30 mg), e álcool etílico em diferentes concentrações também foram utilizados no teste.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana de tinturas de própolis oriunda da cidade de Pirassununga (SP) em diferentes alcoolaturas, frente à cepa de *S. aureus* multirresistente.

Alcoolatura	Halo de inibição (mm) (<i>S. aureus</i> multirresistente)
96%	9
90%	10
80%	10
70%	10
60%	10
50%	10
40%	9
30%	8
20%	0
10%	0
Álcool puro	0
Água pura	0
Vancomicina	18

Agradecimentos: CNPq, FAPERJ, Programa de Bolsas-Treinamento do DAS-UFF e ao apicultor Geraldo Breyer (Taquara-RS).

Referências

- Volpert, R.; Elsten, E.F. Biochemical activities of propolis extracts. II Photodynamic activities. *Z. Naturforsch-C*, v. 48, n. 11,12, p. 858-862, 1993.
- Souza, G.H.B.; Zainaghi, I.A.; Carvalho, J.C.T.; Salvador, S.; Bastos, J.K. Desenvolvimento de metodologia analítica em cromatografia em camada delgada e isolamento de marcadores químicos para controle de qualidade da própolis. *Revista da Universidade de Franca*, ed. Especial, n. 7, p. 36, 1999.
- Levy Jr., N.C. Atividade antimicrobiana da própolis. *Revista da Universidade de Franca*, edição especial, ano 7, n. 7, p. 18, 1999.
- Carvalho, J.C.T. Validação toxicológica de produtos apiterápicos. *Revista da Universidade de Franca*, edição especial, ano 7, n. 7, p. 17, 1999.
- Dos Santos, C.R.; Araújo, G.L.; Carvalho, E.S.; Sharapin, N.; Rocha, L.M.; Teixeira, L.A. Controle de qualidade físico-químico e biológico de tinturas de própolis. *Revista da Universidade de Franca*, edição especial, ano 7, n. 7, p. 35-36, 1999.
- Dos Santos, C.R.; Araújo, G.L.; Carvalho, E.S.; Sharapin, N.; Teixeira, L.A.; Breyer, G.; Rocha, L.M. Otimização de processo extrativo de própolis visando a atividade antimicrobiana. *Anais do Congresso Internacional de propóleos*. Buenos Aires, Argentina, p. 115, 2000.
- Amoros, M.; Simões, C.M.; Girre, L.; Sauvager, F.; Cormier, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*. v. 55, n. 12, p. 1732-1740, 1992.
- Khayyal, M.T.; El-Ghazaly, M.A.; El-Khatib, A.S. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp. Clin. Res.*, v.19, n. 5, p. 197-203, 1993.
- Sud'ima, G.F.; Mirzoeva, O.K.; Pushkareva, M.A.; Korshumova, G.A.; Sumbatyan, N.V.; Varfolomeev, S.D. Caffeic acid, phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* 23, v. 329, n. 1, 2, p. 21-24, 1993.
- Tabera, A.; Bedascarrasbure, E.; Maldonado, L.; Alvarez, A.; Van Der Host, A. Actividad antibacteriana de propóleos argentinos enfrentados a *Staphylococcus aureus*. *Anais do Congresso Internacional de propóleos*, Buenos Aires, Argentina, p. 97, 2000.
- Kartal, M.; Yildiz, S.; Kaya, S.; Kurucu, S.; Topcu, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal Ethnopharmacology*, v. 86, n. 1, p. 69-73, 2003.
- Focht, J.; Hansen, S.H.; Nielsen, J.V.; Van-Den-Berg, S.A.; Riezler, R. Bactericidal effect of própolis *in vitro* against agents causing upper respiratory tract infections. *Arzmeimittelforschung*, v. 43, n. 8, p. 921-3, 1993.
- Hegazi, A.G. Propolis: an overview. *Anais do Congresso Internacional de propóleos*, Buenos Aires, Argentina, p. 35-53, 2000.
- Boyanova, L.; Derejian, S.; Koumanova, R.; Katsarov, N.; Gergova, G.; Mitov, I.; Nikolov, R.; Krastev, Z. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *J. Med. Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 417-419, 2003.
- Fierro, W.M. Evidencia científica del propóleos desde el punto de vista médico. *Anais do Congresso Internacional de propóleos*, Buenos Aires, Argentina, p. 21-31, 2000.
- Barizon, E.; Oliveira, P.; Figueiredo, E.; Figueiredo, C.; Bastos, J.K.; Salvador, S.L. Determinação da atividade antimicrobiana da própolis em solução alcoólica, mel e mel com própolis. *Revista da Universidade de Franca*; ed. especial 7, p. 51, 1999.
- Soares, M.J.S.; Teixeira, L.A.; Nunes, M.R.C.M.; Carvalho, M.C.S.; Ferreira-Carvalho, B.T.; Figueiredo, A.M.S. Analysis of different molecular methods for typing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to the Brazilian epidemic clone. *J. Med. Microbiology*, n. 50, p. 1-11, 2001.
- Larson, E.L. Alcohols. In: (Lea & Febiger) *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Philadelphia: S.S. Block, p. 191-203, 1991.
- Pelczar, M.; Reid, R.; Chan, E.C.S. Controle por agentes químicos. In: *Microbiologia*. São Paulo: Mc Graw-Hill Ltda, p.

497, 1980.

²⁰ Rocha, Leandro. Estudo químico e farmacológico de *Hypericum brasiliense* Choisy. Rio de Janeiro, Dissertação de Mestrado, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais - NPPN - UFRJ, 1991.

²¹ NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. M 7-A 3, 1993.

***Autor para correspondência:**

Prof. Dr. Leandro Machado Rocha
Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais (LTPN) Faculdade de Farmácia - UFF
Rua: Dr. Mário Viana, 523- Santa Rosa
CEP: 24241-002 - Niterói (RJ).
E-mail: farm@cruiser.com.br
Telefax: (21)2610-6654

Sistemas de produção de plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba

Caetano, N.N.^{1*}, Fonte, J.R.², Borsato, A.V.³

^{1*} Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

² Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias Universidade Federal do Paraná

³ Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias Universidade Federal do Paraná

Resumo

Quatro diferentes sistemas de modelos de produção de plantas medicinais na região metropolitana de Curitiba, Paraná, foram estudados. O objetivo do estudo foi analisar os diferentes modelos com uma aproximação holística (sob foco sistêmico) pretendendo, como o resultado final, um sistema de produção alternativo, tecnicamente, economicamente e ambientalmente sustentável. Vários aspectos de qualidade foram especialmente analisados. O trabalho foi desenvolvido durante setembro de 2000 a maio de 2001, usando um levantamento rápido em áreas rurais, com entrevistas semi-estruturadas.

Abstract

Four different medicinal plant production system models in Curitiba Metropolitan Area, Paraná, were studied. The objective of the study was to analyze the different models with a holistic approach (under systemic focus) intending, as the end result, an alternative technically, economically, and environmentally sustainable production system. Several aspects of quality were especially analyzed. The work was developed during September 2000 to May 2001, using a quick survey in rural areas, with semi-structured interviews.

Sendo as plantas medicinais vegetais empregados com fins terapêuticos, devem atender a todos os critérios de eficácia, segurança e qualidade, devendo obrigatoriamente apresentar constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis. Entretanto, sabe-se que alguns parâmetros essenciais para a qualidade podem variar dependendo da procedência do material vegetal¹. Tais variações são relacionadas principalmente à composição química e em alguns casos, à pureza e características fenotípicas. Sendo assim, a origem geográfica exata e as condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, colheita, secagem e armazenamento, bem como de tratamentos com agrotóxicos, descontaminantes e conservantes devem ser conhecidos, conforme preconiza a British Herbal Pharmacopoeia².

Conforme avaliação de Magalhães³, grande parte da responsabilidade da qualidade está nas mãos do agricultor, que poderá primeiramente, 'controlar' a qualidade, ou melhor, 'influenciar' na qualidade e isso vai depender dos procedimentos