

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRÓPOLIS VERDE E ANTIMICROBIANA CONTRA BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA NA AQUICULTURA

Nicolas RIPARI¹; Danielle de Carla DIAS¹; Leonardo TACHIBANA¹; Marco Aurélio
Sivéro MAYWORM²

¹Instituto de Pesca – APTA/SAA, São Paulo, SP ltachiba@gmail.com

²Centro Universitário Adventista de São Paulo (UNASP), São Paulo, SP

Apoio Financeiro: UNASP, São Paulo, SP

Palavras-chave: própolis-verde; aquicultura; DPPH; resazurina

INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa proveniente de substâncias gomosas, resinosas e balsâmicas coletada por abelhas dos ramos, brotos, pólen e exsudados de árvores, onde estas mesmas abelhas ainda acrescentam cera, pólen e secreções salivares para elaborar o produto final (MINISTÉRIO DE AGRICULTURA 2001; GHISALBERTI 1979). A presença de compostos fenólicos em sua composição tem sido associada à atividade antimicrobiana (MANARA 1999) e antioxidante (ALENCAR 2007; MENEZES 2005).

Este trabalho teve como objetivo foi fracionar uma amostra de própolis verde em solventes de polaridades crescentes e avaliar seu potencial antioxidante e antimicrobiano contra *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila*.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma amostra de própolis verde coletada na zona da mata mineira (70g P.F.) foi congelada e pulverizada usando grau e pistilo. O fracionamento foi realizado através de extrações desenvolvidas sob aquecimento, em refluxo, utilizando hexano, diclorometano, etanol e água destilada por seis horas (três repetições). Outra amostra da mesma própolis (20g P.F.) foi submetida a extrações usando apenas etanol a fim de compor um extrato etanólico bruto. Todas as frações obtidas foram acertadas a uma concentração de 2%.

Testes de atividade antioxidante

Para avaliar o potencial antioxidante, usou-se uma solução padrão de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) a 0,004% em cada fração nas concentrações 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,1%, em triplicatas, utilizando tubos de ensaio. Para cada amostra foram utilizados dois tubos (A e B). No tubo A (amostra) foram colocados 2mL de DPPH e 20µL de cada fração, no tubo B (Branco) foram colocados 2mL de etanol e 20µL de cada fração, e no tubo C (controle) foram colocados 2mL de DPPH. Os tubos permaneceram em repouso e protegidos da luz por meia hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm e a atividade antioxidante de cada extrato foi determinada pela equação abaixo (MENSOR 2001).

$$AA\% = 100 - \{[(\text{Abs A} - \text{Abs B}) \times 100] / \text{Abs C}\}$$

Testes de atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo

Inicialmente preparou-se a escala 0,5 Mc Farland adicionando 500 µL de Cloreto de Brário em solução aquosa a 1% em 9,5 mL de ácido sulfúrico a 1% em Caldo Todd Hewitt e Tryptic Soy Broth (TSB). Em seguida, parte destas suspensões foram lidas em espectrofotômetro previamente calibrado com cada caldo correspondente em um comprimento de onda de 530nm. As suspensões bacterianas de *S. agalactiae* e *A. hydrophyla* foram mantidas a 28°C até atingirem a mesma transmitância da escala 0,5 Mc Farland do Caldo Todd Hewitt (para o inóculo de *S. agalactiae*) e TSB (para o inóculo de *A. hydrophyla*). Imediatamente após isso, placas de 96 poços fundo chato, foram usadas para abrigar 20µL do inóculo mais as frações hexânica, diclorometânica, etanólica e o extrato etanólico bruto ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO) e a fração aquosa e hexânica, ressuspensas em água destilada estéril e Tween 80, respectivamente. As concentrações dos extratos foram decrescentes de 500µg/mL a 50µg/mL para determinar concentração inibitória mínima (CIM) sendo o volume final de cada poço da placa 100µL. O controle positivo para estes testes foi feito com 30µg/mL de penicilina mais estreptomicina para os dois microorganismos e o controle negativo foi feito com DMSO, tween 80 e água destilada estéril. Após 24 horas de incubação, foi adicionado em cada poço 15µL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) em solução aquosa e esterilizada a 0,01% para que cada placa fosse incubada por mais 4 horas antes de se realizar a leitura visual. Qualquer alteração na cor da solução de resazurina, nos poços, foi considerada como crescimento bacteriano.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Antioxidante

As frações hexânica (FH) e diclorometânica (FD) apresentaram potencial antioxidante de forma dependente de dose, tendo atividade moderada a 0,5% (%AA FH = 45,46 e AA% FD = 62,73) e alta nas concentrações 1% (%AA FH = 71,18 AA% FD = 78,91) e 2% (%AA FH = 88,13 e AA% FD = 92,05). Já as frações etanólica (FE) e aquosa (FA) apresentaram alta atividade antioxidante a 0,5% (AA% FE = 80,23 e AA% FA = 89,18), 1% (AA% FE = 92,05 e AA% FA = 91,68) e 2% (AA% FE = 92,41 e AA% FA = 92,12) e atividade moderada a 0,25% (AA% FE = 54,46 e AA% FA = 62,51). O mesmo foi observado no extrato etanólico bruto a 0,25% (AA% = 61,25), 0,5% (AA% = 86,90), 1% (AA% = 93,88) e 2% (AA% = 94,34). Todos os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante a 0,1%. Esta alta atividade antioxidante observada em extratos de diferentes polaridades indica a presença de outros compostos capazes de seqüestrar radicais livres nesta amostra de própolis.

Atividade antimicrobiana

As frações diclorometânica e etanólica apresentaram baixa concentração inibitória mínima contra *S. agalactiae* (CIM FD = 300µg/mL, CIM FE = 350µg/mL). O mesmo foi observado no extrato etanólico bruto (CIM = 300µg/mL). As frações aquosa e hexânica não apresentaram CIM nas concentrações testadas indicando que os extratos aquoso e hexânico desta amostra de própolis verde apresentam CIM maiores do que as que foram testadas em nossos ensaios (CIM > 500µg/mL). De forma semelhante, as frações diclorometânica e etanólica foram capazes de inibir o crescimento bacteriano contra *A. hydrophila* (CIM FD = 300µg/mL, CIM FE = 350µg/mL) e as frações aquosa e hexânica não apresentaram inibição de crescimento bacteriano nas concentrações testadas (CIM > 500µg/mL). O extrato etanólico bruto também apresentou baixa concentração inibitória mínima contra *A. hydrophila* (CIM = 300µg/mL). Penicilina mais estreptomicina foi capaz de inibir o crescimento bacteriano à 30µg/mL e houve crescimento bacteriano nos controles negativo. A alta atividade antimicrobiana observada contra bactérias de importância na aquicultura sugere um potencial fitoterápico para criadouros de espécies de peixes vulneráveis a estes microrganismos.

CONCLUSÃO

A amostra de própolis verde usada neste estudo apresenta alta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* e alta atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M., OLDONI, T. L. C., CASTRO, M. L., CABRAL, I. S. R., COSTA-NETO, C. M., CURY, J. A., ROSALEN P.L. & IKEGAKI, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of ethnopharmacology*, 113(2), 278-283.
- BRASIL. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA N.º 3, de 19 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, D.F. 23 de jan 2001, Seção 1, p. 18-23.
- GHISALBERTI, E.L. 1979. Propolis: a review. *Bee World*, 60: 59-84. MANARA LRB, GROMATZKY A, CONDE MC, BRETZ WA. 1999. Utilização da própolis em Odontologia. *Rev FOB*, 7(3): 15-20.
- MENEZES, H. 2005. Propolis: a review of the recent studies of pharmacological properties. *Arq Inst Biol*, 72: 405-11.
- MENSOR, L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., SANTOS, T. C. D., COUBE, C. S., & LEITÃO, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*, 15(2), 127-130.
- SANTOS, F. A., BASTOS, E. M. A., UZEDA, M., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M., MOREIRA, E. S. A., & BRAGA, F. C. (2002). Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *Journal of ethnopharmacology*, 80(1), 1-7.