

Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha

L. S. Mendonça¹; Y. L. F. Maia-Araújo²; S. C. Orellana³; J. C. Cardoso¹; E. D. Araújo⁴

¹Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Laboratório de Biomateriais, Universidade Tiradentes, 49032-490, Aracaju-Se, Brasil.

²Laboratório de Cromatografia e Flavor, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

³Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, 30190-110, Belo Horizonte-MG – Brasil

⁴Laboratório de Genética e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-Se, Brasil

(Recebido em 03 de outubro de 2011; aceito em 03 de outubro de 2011)

A própolis é uma complexa mistura de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, elaboram e depositam em seus ninhos, com o objetivo de vedar a colméia. O objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana das frações bioativas da própolis vermelha frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Escherichia coli* (ATCC 14948) e a possível relação entre a presença de atividade e a coloração vermelha do extrato. O extrato de própolis vermelha foi preparado pelo método de maceração a frio. Após a preparação o extrato foi ressuscitado, impregnado em sílica gel e submetido à cromatografia em coluna aberta, utilizando solventes em gradiente de polaridade, partindo do solvente de menor polaridade para o de maior polaridade. Foram realizados testes de sensibilidade antimicrobiana das 10 frações obtidas frente às cepas descritas e dentre os resultados das frações que apresentaram sensibilidade, as do grupo 1 apresentaram sensibilidade frente aos dois microrganismos testados, sendo significativa maior que sensibilidade apresentada pelas demais frações frente a *S. aureus*, enquanto as frações dos grupos 2 e 4 não apresentaram resultados significativos de sensibilidade para *Escherichia coli* e menor sensibilidade frente a *S. aureus*. Todas as frações que apresentaram alguma sensibilidade estavam entre as obtidas dos solventes de menor polaridade. A fração de coloração vermelha não apresentou inibição frente aos microrganismos utilizados, pode-se supor, portanto, que apesar da coloração ser um indicador para a identificação dessa variedade, a cor da própolis provavelmente não esteja diretamente associado à presença de atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Coluna Aberta, Sensibilidade, *própolis vermelha*

Propolis is a complex mixture of substances that bees collect from various plants. It is placed in their nests, in order to seal the hive. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the bioactive fractions of propolis against *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) and *Escherichia coli* (ATCC 14948) and to analyse the possible relationship between the presence of red color and activity of the extract. The propolis extract was prepared by the method of cold maceration. It was then resuspended, impregnated in silica gel and subjected to open column chromatography using solvent polarity gradient, starting from the lower solvent polarity to the highest polarity. Antimicrobial susceptibility tests were performed with 10 fractions of propolis. The results showed that among the fractions that showed sensitivity, group 1 (G1) showed sensitivity to the above two microorganisms, with values significantly greater against *S. aureus* than those shown by other fractions. The fractions 2 and 4 did not show significant sensitivity to *E. coli* and showed reduced sensitivity against *S. aureus*. All fractions that showed some sensitivity were obtained between the solvents of lower polarity. The fraction of red staining showed no inhibition against the microorganisms used, thus can be assumed, that despite the color being an indicator for the identification of this variety of propolis, it is probably not directly associated with the presence of antimicrobial activity.

Keywords: antimicrobial activity, bioactive fractions, propolis

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma complexa mistura de substâncias resinosas que as abelhas coletam de diferentes partes das plantas e depositam em seus ninhos, com o objetivo de vedar a colmeia [1,2]. Portanto, a composição da própolis é um reflexo direto da flora utilizada pelas abelhas [3]. Existem estudos relatando que a composição química da própolis pode variar de acordo com a sazonalidade regional, o que pode influenciar o seu potencial de ação [4,5].

Após o processamento e análise de alguns tipos de própolis brasileiras, quanto à aparência e coloração dos extratos, Park *et al.*, [6] classificaram as amostras em 12 grupos, com base em suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Dausch *et al.*, [1] verificaram no litoral do nordeste brasileiro um novo tipo de própolis de coloração vermelha com características físico-químicas e biológicas diferenciadas, classificando-a como do grupo 13. A própolis vermelha brasileira possui novos compostos bioativos nunca antes encontrados nos produtos já estudados [7].

Mais de 300 constituintes já foram identificados e caracterizados em diferentes amostras de própolis [8]. Os compostos isolados dos diversos tipos de própolis são principalmente flavonóides e ácidos fenólicos, que são componentes associados a bioatividade frente a vários microrganismos patogênicos. A ação antimicrobiana da própolis tem sido amplamente investigada [9]. Alguns estudos realizados afirmaram que a própolis apresenta atividade antimicrobiana independente da sua origem, devido ao efeito bactericida e fungicida imprescindível para preservar a vida na colmeia [10].

Uma técnica usada para a identificação dos compostos bioativos da própolis é a cromatografia em coluna aberta, que separa os componentes da mistura de acordo com a sua polaridade. Este é um método físico-químico de separação utilizado para o isolamento de produtos naturais e para a purificação de produtos de reações químicas [11]. A análise das frações e das substâncias puras em relação a sua concentração permite predizer se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado [12]. Com isso, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade antimicrobiana de diferentes frações bioativas da própolis vermelha frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Escherichia coli* (ATCC 14948).

2. MATERIAL E MÉTODOS

A própolis vermelha utilizada foi coletada em um apiário localizado no município de Brejo Grande/SE, em região de restinga localizada na região da foz do rio São Francisco (S 10°28'40", W 36°26'12"). A amostra fresca foi acondicionada em recipiente plástico e mantida sob refrigeração até a preparação do extrato. Foi realizada extração a frio de 2 g de própolis em 25 ml de etanol 70% sob agitação constante durante 2 horas. O extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) foi evaporado em capela de exaustão e em seguida submetido ao dessecador com sílica para evaporação até manter peso constante. Para a separação dos compostos da própolis, o extrato foi ressuspensionado em 5 mL de álcool absoluto e em seguida misturado a 3 g de sílica gel. A sílica impregnada foi levada à capela de exaustão para que houvesse a evaporação do solvente. A separação dos compostos foi feita por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando uma coluna de vidro (F = 15 mm, h = 280 mm). A montagem da coluna cromatográfica foi realizada segundo referências clássicas em química orgânica experimental [13,14]. A coluna foi preenchida com sílica gel 60 na fase inferior e na fase superior preenchida com 1,1 g da sílica gel impregnada com o extrato de própolis vermelha (Figura 1), sendo estas fases separadas com papel filtro. Na fase móvel foram sempre utilizados 60 mL do solvente, iniciando com uma baixa polaridade (éter etílico) e aumentando gradativamente (acetato de etila, álcool etílico) até o solvente mais polar (álcool metílico).



Figura 1 – Sílica impregnada com própolis vermelha

A avaliação da atividade antimicrobiana da própolis vermelha sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi realizada em triplicata pela técnica de difusão em poços, conforme metodologia descrita para esse fim [15]. O volume das frações bioativas da própolis vermelha testada foi de 15 μ L na concentração de 5%.

O inóculo microbiano foi padronizado de acordo com a escala 0,5 Mc Farland e semeado em superfície em placas de Petri contendo meio Agar Mueller Hinton. O controle negativo utilizado no teste foi o solvente etanol 70% e o controle positivo o Cloranfenicol, antimicrobiano comercial de referência.

O ensaio biológico foi submetido à análise de variância (ANOVA), e posteriormente, ao teste de Tukey para comparação das médias do tamanho dos halos de inibição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações foram coletadas em tubos de ensaio de 10 mL e foram separadas em 10 grupos, classificados de acordo com o solvente utilizado e a mudança de coloração (Figura 2). Foi verificada a ação antibacteriana apenas nas frações coletadas nos grupos I, II e IV que possuíam solventes de menor polaridade (tabela 1).



Figura 2- Variação de coloração de algumas das frações do extrato de própolis vermelha

Não houve formação de halo de inibição nas frações dos demais grupos que continham na sua composição solventes mais polares. Esses resultados corroboram com a literatura, uma vez que os compostos fenólicos presentes na própolis vermelha, geralmente associados a atividades antimicrobianas, possuem maior afinidade por solventes de menor polaridade [18].

Na tabela 1 estão descritos os grupos classificados de acordo com o tipo de solvente utilizado na extração, iniciando com o Grupo G1 (menos polar) ao Grupo G10 (mais polar).

Tabela 1. Frações extraídas de própolis vermelha com seus respectivos solventes e halos de inibição

Grupo	Solvente (60 mL)	Halo inibição (mm)	
		<i>S aureus</i>	<i>E. coli</i>
G1	Éter etílico 100%	15,0±0,2	9,0±0,1
G2	Éter etílico + acetato de etila (2:1)	9,5±0,1	-
G3	Éter etílico + acetato de etila (1:2)	-	-
G4	Acetato de etila 100%	8,5±0,2	-
G5	Acetato de etila + álcool etílico (2:1)	-	-
G6	Acetato de etila + álcool etílico (1:2)	-	-
G7	Álcool etílico 100%	-	-
G8	Álcool etílico + Álcool metílico (2:1)	-	-
G9	Álcool etílico + Álcool metílico (1:2)	-	-
G10	Álcool metílico 100%	-	-

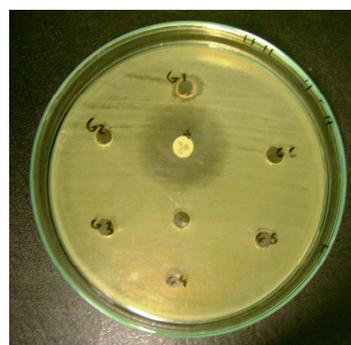
(-) Não houve inibição

As substâncias responsáveis pela pigmentação vermelha da própolis utilizada nesse estudo estavam presentes nas frações mais polares dos grupos G4, G5 e G6 e esse é um resultado bastante significativo. Considerando que os tipos de própolis brasileiras são geralmente classificados pela coloração, a cor vermelha da própolis não pode ser utilizada como um indicador direto da presença de atividade antimicrobiana, ao menos em relação aos microrganismos testados. Portanto, não é adequado caracterizar um tipo de própolis quanto a seu potencial biológico apenas pela sua cor, uma vez que variedades de própolis que não tenham coloração vermelha não são necessariamente desprovidas de princípios ativos presentes nas frações da própolis vermelha que conferem atividades antimicrobianas, o que faz da coloração da própolis um indicador pouco relevante e demasiadamente simplista.

De acordo com a figura 3, pode-se observar que as frações do grupo G1 apresentaram atividade frente aos dois microrganismos testados, sendo que em *S. aureus* o halo de inibição foi maior que o apresentado no teste realizado com a *E. coli*. Esse resultado corrobora resultados anteriores [16] que confirmaram que a própolis apresenta maior atividade frente às bactérias Gram positivas e atividade reduzida frente às bactérias Gram negativas.



A



B

Figura 3 – Halos de inibição frente a *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) produzidos pela fração de menor polaridade (G1) do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.

Para a linhagem da bactéria *E. coli* apenas a fração G1 apresentou formação de halo de inibição.

Os resultados do presente estudo permitem inferir que os componentes existentes na fração de Éter etílico (Grupo 1) possuem atividade inibitória para ambos os microrganismos. Porém a bactéria *S. aureus* mostrou-se suscetível também para os compostos existentes na fração de Acetato de etila (Grupo 4). Postula-se, portanto, que os compostos com atividade antimicrobiana estão presentes nas frações menos polares do extrato da própolis vermelha. Vale salientar que a fração de coloração vermelha não apresentou inibição frente aos microrganismos utilizados e pode-se supor, portanto, que apesar da coloração ser um indicador para a identificação dessa variedade, a cor da própolis provavelmente não esteja diretamente associado à presença de atividade antimicrobiana.

Segundo Brasileiro *et al.*, [17], a atividade antimicrobiana só deve ser considerada quando o halo de inibição apresentado for maior ou igual ao do controle positivo testado. No entanto, é importante considerar que o controle positivo usado no teste é uma droga pura e em concentração definida e padronizada, enquanto no extrato natural não se sabe ao certo qual(is) o(s) composto(s) ativo(s) ou sua(s) concentração (ões). Logo, estes “antibióticos naturais” precisam ser mais profundamente analisados para então refutar ou não o seu uso.

De acordo com os dados apresentados na tabela 2, é possível observar que existe diferença significativa entre as frações do grupo 1 (G1) e os grupos 2 e 4 (G2 e G4), considerando $p < 0,01$; e que a fração G1 demonstra ser mais ativa frente a *S. aureus*, por apresentar um maior halo de inibição, enquanto que, os grupos G2 e G4 não apresentaram diferença estatística significativa.

Tabela 2: Comparação das médias dos diâmetros (mm) dos halos de inibição entre os grupos 1,2 e 4 das frações ativas do extrato bruto de própolis vermelha frente a *S. aureus*.

Grupo	Medidas
G1	15.66 ^a
G2	9.66 ^b
G4	8.66 ^b

Não foi necessário realizar análise estatística dos dados para *Escherichia coli*, uma vez que, apenas o G1 foi ativo frente a este microrganismo.

4. CONCLUSÃO

A composição da fração solúvel em éter etílico do extrato da própolis vermelha grupo 1 (G1) demonstrou atividade frente aos dois microrganismos *S. aureus* e *E. coli*. Além da fração G1 as frações do G2 e G4 apresentaram ação inibitória apenas para *S. aureus*, sendo que o solvente utilizado nestes dois grupos foi acetato de etila. Existe diferença significativa entre as frações existente entre os grupos 1, 2 e 4, mostrando que, a fração do G1 testada frente a *S. aureus* mostrou ser mais eficiente. Apesar de a coloração ser um indicador para a identificação dessa variedade, a cor da própolis vermelha não está diretamente associada à presença de atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados.

-
1. DAUGSCH, A; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM*. 5(4): 435-441 (2007).

2. LOTTI, C.; FERNANDEZ, M. C.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I. M.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:2209-2213 (2010).
3. RUSSO, A.; LONGO, R. E.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 73:21-29 (2002).
4. SFORCIN, J.M, FERNANDES J.R.A, LOPES, C.A.M., BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal Ethnopharmacol*. 73: 243-249 (2000).
5. CASTRO, M. L.; CURY, J.A; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e Nordeste do Brasil: influencia da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*. 30(7): 1512-1516 (2007).
6. PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*. 58:3-7 (2000).
7. 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. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113(2): 278-283 (2007).
8. PICCINELLI, A.L; CAMPO, M. CUESTA-RUBIO, O. MARQUEZ, I.; DE SIMONE, F. RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from cuban própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 9010-9016 (2005).
9. SILVA, B. B. Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP. 2008.
10. BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M.; SANTOS, M.T.; ROSA, M.R.; QUINÁIA, S.P.; TORRES, Y.R.; SANTA, H.S.D.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; FERREIRA, P.M.P.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico *Química Nova*. 32(2): 296-302 (2009).
11. COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. Ed. UNICAMP. São Paulo, 1997.
12. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*. 21 (1998).
13. VOGEL, A.I.; Textbook of Practical Organic Chemistry; 4 ed., Longman, London, 745-746 (1978).
14. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ JR, G. S.; Introduction to Organic Laboratory Techniques, a Contemporary Approach; Saunders College Publ., Philadelphia: 231-239 (1982).
15. MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C., ARAUJO, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Revista Scientia Plena*, 7(4) (2011).
16. PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 17(1) (2007).
17. BRASILEIRO, B. G.; PIZZILO, V. R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*. 42(2) (2006).
18. CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quím. Nova* [online]. 32(6):1523-1527 (2009).