



Volume 1 | Número 2  
2021

ISSN: 2763-6887

**Sobre os Autores:**

Carlos Alfredo L. de Carvalho é Engenheiro Agrônomo/UFBA, Mestre em Ciências Agrárias/UFBA e Doutor em Ciências (Entomologia)/USP.

Marly S. Santos é Nutricionista/UFRB, Mestre em Microbiologia Agrícola/UFRB e Doutora em Alimentos, Nutrição e Saúde/UFBA.

# Boletim Técnico-Científico Insecta

Publicação do Grupo de Pesquisa Insecta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

## PREPARAÇÃO DE EXTRATOS SECOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

Marly Silveira Santos

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

## Apresentação

O Boletim Técnico Científico Insecta tem por objetivo divulgar técnicas e informações científicas de aplicação na entomologia e áreas afins, de maneira clara e objetiva, contribuindo para suprir lacunas da literatura brasileira ou ampliando as informações disponíveis sobre temas específicos, focando o estudo dos insetos ou suas relações com outras áreas do conhecimento.

Pretende-se colaborar na divulgação de técnicas e ferramentas que ajudem na execução de ensaios técnicos e científicos, assim como, revisões e impressões sobre temas específicos da entomologia e áreas correlatas.

Neste número é abordado o tema PREPARAÇÃO DE EXTRATOS SECOS HIDROALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS, com a apresentação de fluxogramas e outras informações relevantes sobre o tema.

Conselho Editorial

### Sobre o Grupo de Pesquisa Insecta:

O Grupo de Pesquisa Insecta (GPI), entre 1992 e 2005, ainda na Universidade Federal da Bahia (UFBA), deu suporte para estágios de discentes da graduação, incluindo as modalidades de supervisionado, voluntário, como também, Trabalho de Conclusão de Curso. Nesse período, a maioria dos discentes eram do Curso de Agronomia, cujos egressos realizaram pós-graduação e ou foram inseridos no mercado de trabalho. Dentre esses estudos, destacaram-se os trabalhos com vespas sociais (e.g.: espécies de *Apoica*, *Mischocyttarus*, *Polistes*, *Polybia*, *Synoeca*, entre outros gêneros), insetos de interesse no controle de pragas como agente de predação. Nessa época também foram importantes os estudos sobre formigas predadoras (e.g.: espécies de *Ectatomma*, *Odontomachus*, entre outros gêneros) e besouros coprófagos (Scarabaeidae), além dos estudos da entomofauna do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), girassol (*Helianthus annuus*), feijão guandu (*Cajanus cajan*), cacau (*Theobroma cacao*), batata-doce (*Ipomoea batatas*), cultura da berinjela (*Solanum melongena*), cultura do amendoim (*Arachis hypogea*), cultura do quiabo (*Abelmoschus esculentus*), laranjeiras (*Citrus*), cultivo da erva-doce (*Pimpinella anisum*), do coentro (*Coriandrum sativum*), dentre outras culturas. Nessa ocasião, além das atividades de ensino de graduação e de pesquisa, muitas atividades de extensão foram desenvolvidas, tanto como o suporte à agricultores na identificação de pragas agrícolas, como em campanhas em parceria com a então EMATER-BA e a Embrapa, como a campanha de combate à *Ortezia praelonga* na região. Aos 29 anos de atividade (1992-2021), continua firme rumo aos seus 30 anos de atividade.

## PREPARAÇÃO DE EXTRATOS SECOS HIDROALCÓOLICOS DE PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

Marly Silveira Santos<sup>1\*</sup> & Carlos Alfredo Lopes de Carvalho<sup>1,2</sup>

1 Pesquisadora do Grupo de Pesquisa Insecta da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA;

2 Docente da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas-BA

\* Autor correspondente

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 e, em vista disso, a composição da própolis se apresenta como um reflexo direto da flora utilizada pelas abelhas (CASTRO et al., 2009). A composição da própolis varia em função de diversos fatores, dentre eles a estação do ano, tipo de vegetação, origem geográfica, e estado da própolis (fresco ou envelhecido) (CRUZ et al., 2008). Já a geoprópolis é o termo utilizado para a resina misturada com sedimento de terra ou barro produzida por determinadas espécies de abelhas sem ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997; CARVALHO et al., 2005). Para estabelecer critérios, procedimentos e práticas específicas da fabricação do extrato da própolis e testes de atividade antimicrobiana, de forma a garantir a qualidade ao produto final, além de atender aos requisitos básicos para produção inócua, é necessário seguir as normas estabelecidas em BRASIL (2001). Como a geoprópolis ainda é pouco estudada, ajustes devem ser estabelecidos a partir destas normas.

O presente trabalho teve como objetivos específicos descrever o procedimento de obtenção dos extratos hidroalcoólicos da própolis e da geoprópolis (Figura 1), bem como avaliar as suas atividades antimicrobianas.



**Figura 1.** Coletor de própolis (A, B) em colmeia tipo Langstroth (*Apis mellifera*) e de geoprópolis (C) em caixa tipo INPA (*Melipona scutellaris*).

## **Procedimento para a obtenção do extrato seco hidroalcoólico da própolis.**

**1º Passo:** macerar a própolis bruta;

**2º Passo:** pesar 1g de própolis e colocar em tubo Falcon com 12,5mL de álcool etílico a 70%. Posteriormente levar ao Vórtex para homogeneização, em seguida deixar de um dia a outro em média 12 a 24 horas, vale ressaltar que proporção usada deve ser (30% da própolis para 70% do álcool etílico a 70%, ou álcool cereais a 70%);

**3º Passo:** colocar os tubos de Falcon no banho ultrassônico por 60 min;

**4º Passo:** posteriormente centrifugar os tubos por 5min a 3.000 rpm, em seguida deixar repousar por 1h e depois filtrar no papel filtro diretamente em uma placa de Petri que foi anteriormente aferida seu peso. A placa de Petri deve ser pesada inicialmente sem o líquido, individualmente, e o valor obtido será utilizado posteriormente fazer o cálculo do rendimento;

**5º Passo:** colocar a placa de Petri na capela de exaustão até evaporação total do álcool, que normalmente dura em torno de 2 a 3 dias, dependendo do volume adicionado na placa;

**6º Passo:** retirar as placas de Petri da capela de exaustão e colocar no dessecador para descansar; no dia seguinte proceder a pesagem a cada duas horas até obter um peso constante; o dessecador já deve estar com a sílica gel ativada;

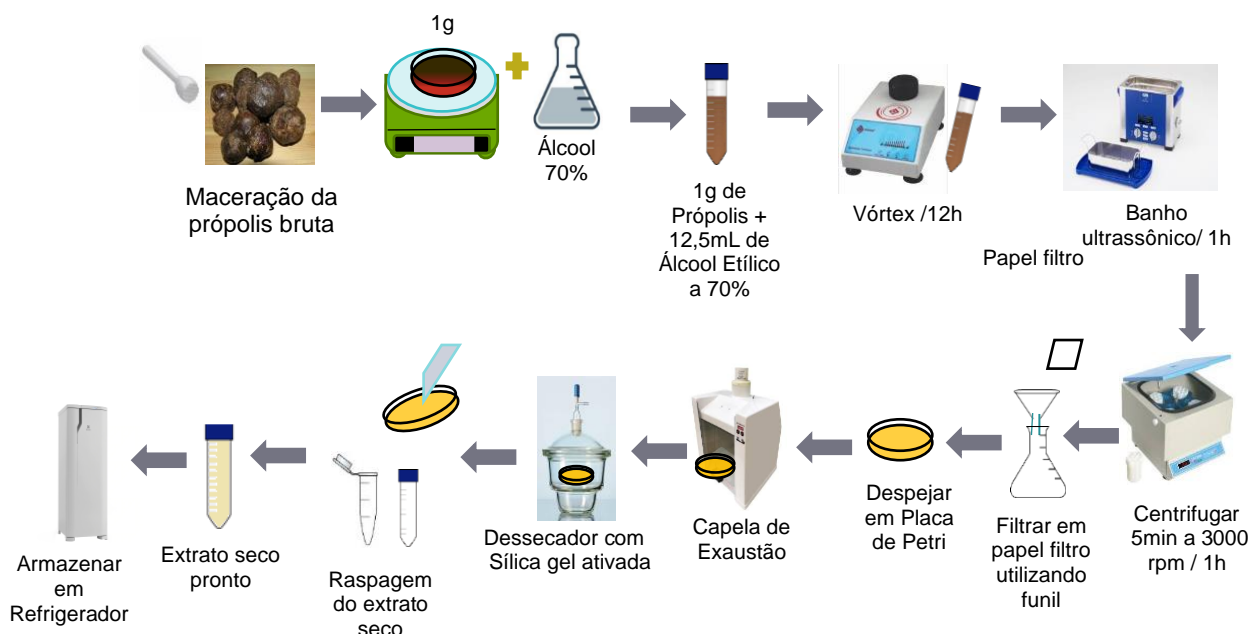
**7º Passo:** calcular o rendimento, por meio da fórmula:  $\text{Rendimento (R)} = \text{Peso final da placa de Petri (pf)} - \text{Peso inicial da placa de Petri (pi)}$ ;

**8º Passo:** registrar o peso inicial dos Eppendorf ou tubos Falcon que serão utilizados, individualmente;

**9º Passo:** fazer a raspagem do extrato seco e depositar no Eppendorf ou tubo Falcon; no caso de não conseguir fazer a raspagem com facilidade, utilizar o álcool absoluto com auxílio de uma micropipeta e retornar para o 5º Passo;

**10º Passo:** com o extrato seco da própolis pronto é o momento de ressuspender na concentração e no solvente desejado.

Um fluxograma dos passos acima é observado na Figura 2.



**Figura 2.** Fluxograma da preparação do extrato seco da própolis.

### Procedimento para a obtenção do extrato seco hidroalcoólico da geoprópolis

**1º Passo:** realizar a maceração da geoprópolis;

**2º Passo:** pesar 1g da geoprópolis e colocar em tubo Falcon com 12,5mL de Álcool Etílico a 70%. Posteriormente levar ao Vórtex para homogeneização, em seguida deixar de um dia a outro em média 12 a 24 horas, vale ressaltar que proporção usada deve ser (30% da geoprópolis para 70% do Álcool Etílico a 70%, ou álcool cereais a 70%);

**3º Passo:** colocar os tubos de Falcon no Banho Ultrassônico por 60 min;

**4º Passo:** posteriormente centrifugar os tubos por 5min a 3000 rpm, depois deixar repousar por 1h, em seguida filtrar no papel filtro diretamente na placa de Petri pesada (a placa de Petri deve ser pesada inicialmente sem o líquido e anotado esse valor para posteriormente fazer o cálculo do rendimento);

**5º Passo:** colocar a placa de Petri na capela de exaustão até evaporação total do Álcool (que dura em torno de 2 a 3 dias dependendo do volume adicionado na placa);

**6º Passo:** retire as placas de Petri da capela de exaustão, coloque no dessecador para descansar e no dia seguinte realize a pesagem a cada duas horas

até obter um peso constante. (Obs: o dessecador já deve estar com a sílica gel ativada);

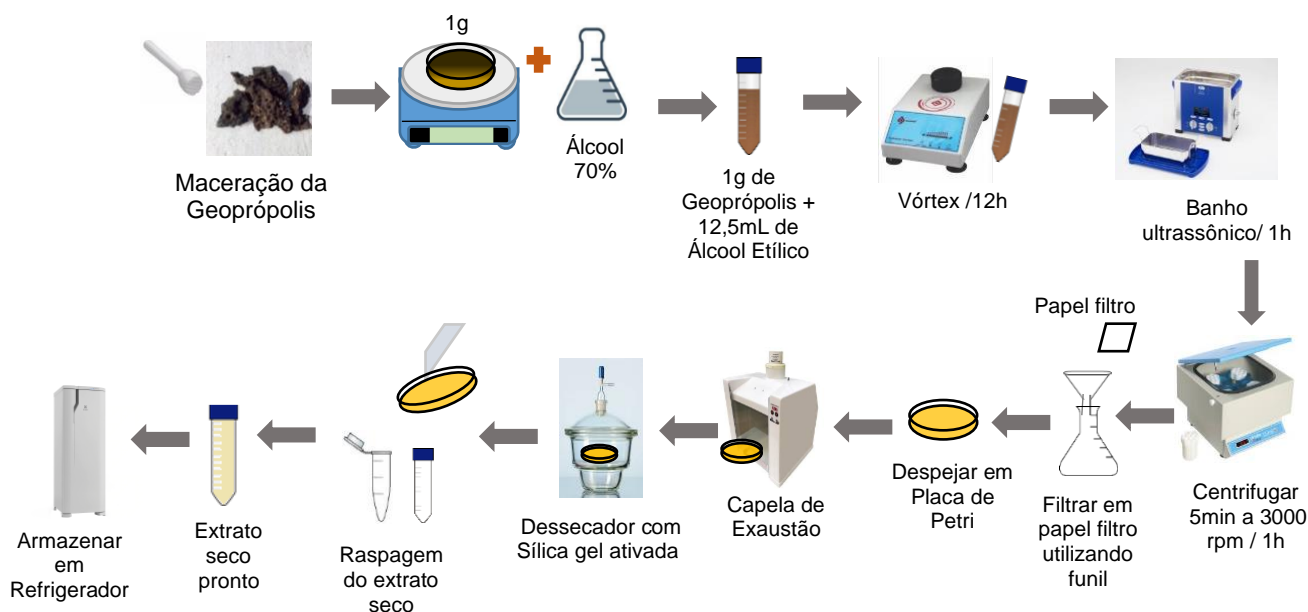
**7º Passo:** cálculo de rendimento:  $\text{Rendimento (R)} = \text{Peso final da placa (pf)} - \text{Peso inicial da placa (pi)}$ ;

**8º Passo:** registrar o peso inicial dos Eppendorf que serão utilizados;

**9º Passo:** fazer raspagem do extrato seco e depositar no Eppendorf ou tubo Falcon (caso não consiga fazer a raspagem com facilidade, devemos utilizar o Álcool absoluto com auxílio de uma micropipeta e retornar ao passo 5º);

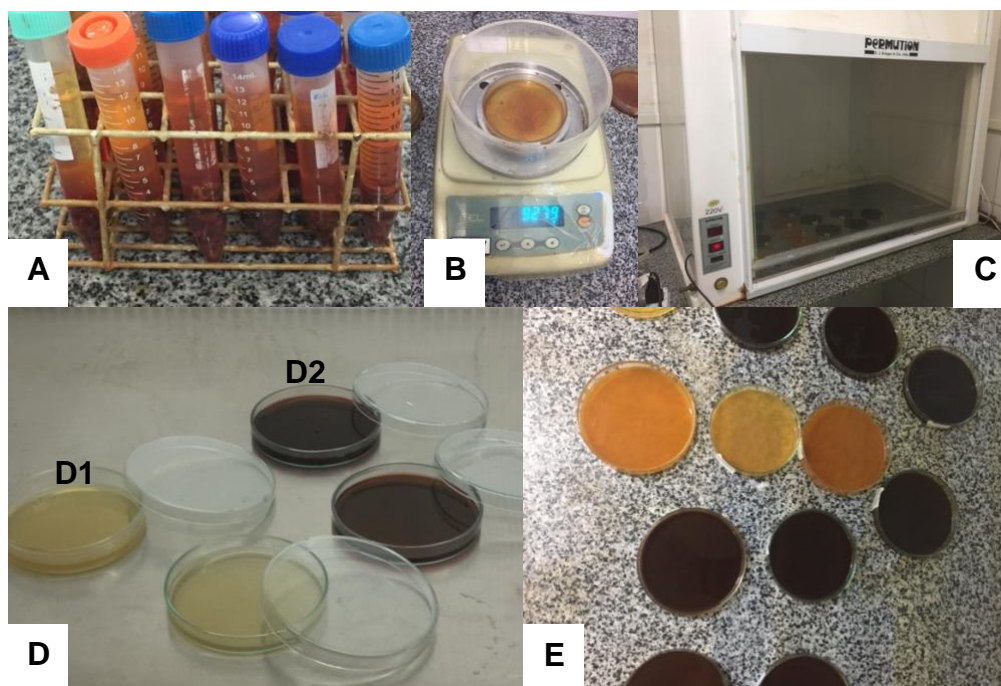
**10º Passo:** extrato seco da geoprópolis pronto, hora de ressuspender na concentração e solvente desejado.

Os passos acima são observados na Figura 3.



**Figura 3.** Fluxograma do extrato seco da geoprópolis.

Imagens desses processos podem ser observados na Figura 4, tanto para a produção do extrato de própolis, quanto do extrato da geoprópolis.

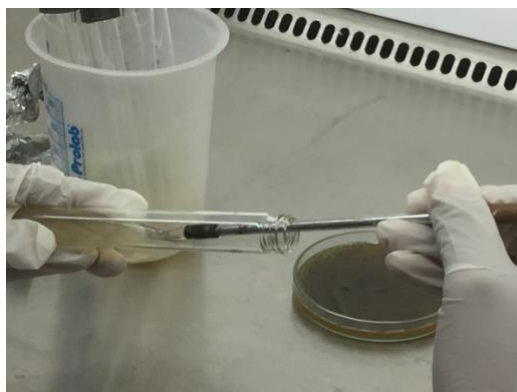


**Figura 4.** Imagens da preparação do extrato seco da própolis e geoprópolis. A. Matéria prima bruta em 12mL de álcool; B. Peso do extrato líquido; C. Secagem das placas com os extratos líquidos; D. Placas com extrato líquido (D1) e com extrato seco (D2); E. Placas com extrato seco prontas para raspagem.

## Avaliação da atividade microbiana do extrato hidroalcoólico da própolis

### Preparo das cepas

As bactérias serão reativadas em Caldo de Infusão Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C durante 24h. As leveduras serão reativadas em caldo Sabouraud dextrose, com incubação de 48 h à 28 °C. Serão diluídas em solução salina, para obtenção de inócuos no padrão de turbidez do tubo 0,5 da escala de Mac Farland, que equivale à concentração final de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL para bactérias e 2 a  $5 \times 10^6$  UFC/mL para leveduras, realizando a leitura de absorvância de 540 nm para bactérias e 640nm para leveduras (Figura 5).



**Figura 5.** Coleta da alíquota de inóculo com o auxílio de alça de níquel e transferência para a placa de Petri contendo meio específico para bactérias e para levedura

### **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Biocida Mínima (CBM) de extratos hidroalcoólico de própolis e geoprópolis.**

Em cada poço de microplacas de poliestireno com 96 poços adicionar 100  $\mu\text{L}$  do caldo nutriente, posteriormente adicionar 100  $\mu\text{L}$  do extrato da própolis ou geoprópolis, em seguida realizar a diluição seriada e acrescentar 30  $\mu\text{L}$  resazurina e 20  $\mu\text{L}$  do inóculo.

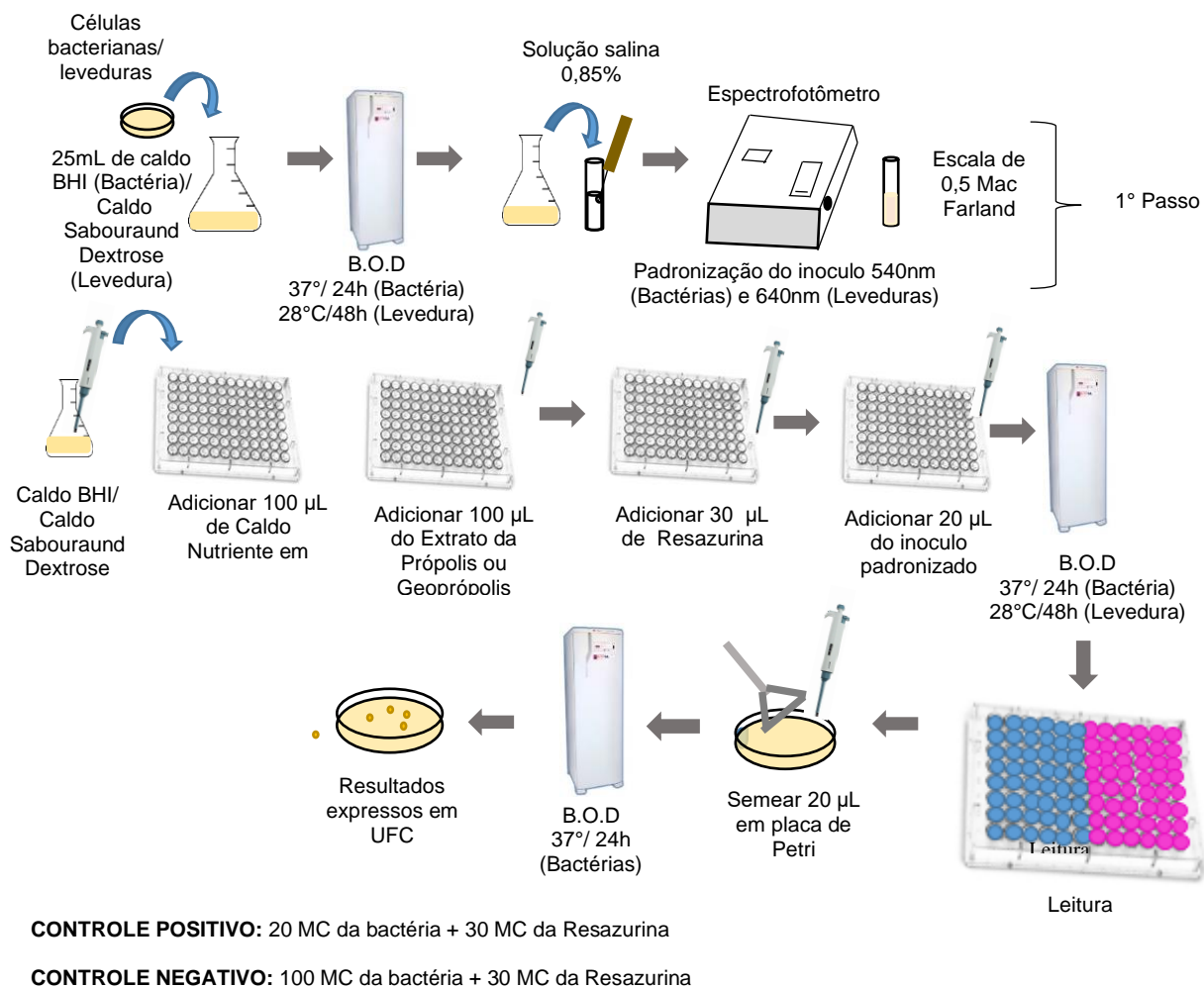
Para o teste do controle positivo será utilizada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura já adicionada na microplaca e adicionará 20  $\mu\text{L}$  dos microrganismos e 30  $\mu\text{L}$  resazurina. Para o controle negativo, 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura já adicionada na microplaca, e 30  $\mu\text{L}$  resazurina será adicionado. As microplacas serão incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias e 28°C por 48 horas para leveduras. Na leitura visual será observada a mudança da cor azul (original da resazurina) para rosa, caracterizando redução desse corante nos poços onde haverá viabilidade bacteriana, e nos poços onde a cor permanecer azul irá se entender que não houve redução do corante, indicando inviabilidade bacteriana, conseqüentemente inibição dos microrganismos.

O teste de concentração bactericida mínima (CIM) será definida como a menor concentração de extrato de própolis que impedia a mudança de cor do meio e exibia inibição completa do crescimento microbiano. De cada poço das microplacas que não apresentaram crescimento visível e/ou alteração de cor, serão retiradas alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  e semeadas em placas de Petri contendo meios para cada bioindicadores analisados, para as bactérias as placas de Petri serão incubadas a 37°C por 24 h (bactérias) e 28°C por 48 horas (leveduras). A CBM será determinada nas placas em



que o crescimento era menor ou igual a 10 UFC. Os resultados serão expressos em CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) e CBM ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os experimentos deverão ser conduzidos em triplicado para cada espécie de microrganismo teste.

O fluxograma dos passos acima é encontrado na Figura 6.



**Figura 6.** Fluxograma para a avaliação da atividade microbiana do extrato hidroalcoólico de própolis ou de geoprópolis.

### Agradecimentos

Aos Consultores *ad hoc* pelas contribuições. Ao CNPq pela Bolsa PQ concedida à CALC. À Dra. Samira Maria Peixoto Cavalcante Silva e a Iago de Jesus Freire pelas colaborações junto ao Laboratório de Análises Físico-Químicas e Caracterização dos Produtos das Abelhas do Grupo de Pesquisa Insecta/CCAAB/UFRB.

## Referências Bibliográficas

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. 19 de janeiro de 2001.
- CARVALHO, C. A. L. de; SOUZA, B. de A.; SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R. M. de O. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. 1. ed. Cruz das Almas-BA: Gráfica e Editora Nova Civilização, 2005. 32p.
- CASTRO, M. L.; NASCIMENTO, A.M.; IKEGAKI, M.; COSTA-NETO, C.M.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.14, p.5332-5335, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.04.066>
- CRUZ, C.; CAVBACO, A.M.; GUERRA, R.; ANTUNES, D.; GUIA, H.; MIGUEL, M.G. A first approach to the optical and antioxidant properties of propolis collected at different sites of Algarve region. 4th IASME/WSEAS International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development (EEESD'08), v. 9, p. 532-536, 2008.
- MAIA-ARAUJO, 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. **Scientia Plena**, v. 7, p. 046201-1-4, 2011.
- MORAIS, M. *et al.* Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food Chemical and Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1096-1101, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.020>.
- NOGUEIRA NETO, P. Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo, SP: Nogueirapis, p. 445, 1997.
- PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.3, p.313-318, 1998.



**Boletim Técnico-Científico  
*Insecta*, v.1, n. 2, 2021**

Esta publicação está disponível no endereço:  
<https://www.ufrb.edu.br/boletiminsecta>

1ª Edição  
Versão eletrônica (2021)

Grupo de Pesquisa *Insecta*, CCAAB, UFRB, Rua  
Rui Barbosa, 710 - Centro - Cruz das Almas/BA -  
44.380-000

**Conselho Editorial:**

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho  
Edilson Divino Araújo  
Geni da Silva Sodré  
Gilberto Marcos de Mendonça Santos  
Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa  
Reginaldo Barros  
Yzila Liziane Farias Maia de Araújo  
Zuleide Silva de Carvalho