



Boletim Técnico-Científico Insecta

Volume 1 | Número 3
2021

ISSN: 2763-6887

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

Sobre os Autores:

Yzila Liziane Farias Maia de Araújo é Bióloga/UNIT, Mestre em Saúde e Ambiente e Doutora em Biotecnologia/Renorbio - UFS.

Lucyana Santos de Mendonça é Bióloga/UNIT, Mestre em Saúde e Ambiente e Doutora em Biotecnologia/Renorbio - UFS.

Sara Cuadros Orellana é Bióloga/USP, Mestre em Genética/USP-RP e Doutora em Ciências de Alimentos pela UNICAMP.

Geni da Silva Sodré, é Engenheira Agrônoma/UFBA, Mestre em Ciências (Entomologia)/USP e Doutor em Ciências (Entomologia)/USP.

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

Edilson Divino de Araújo é Biólogo/UFG, Mestre em Genética/UFG e Doutor em Ciências Biológicas/IBRC, UNESP-Rio Claro.

EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERMELHA POR DIFERENTES MÉTODOS

Yzila Liziane Farias Maia de Araujo

Lucyana Santos de Mendonça

Sara Cuadros Orellana

Geni da Silva Sodré

Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

Edilson Divino de Araujo

**Sobre o Grupo de
Pesquisa Insecta:**

As pesquisas no GP Insecta, cujo lastro de criação foi o Laboratório de Entomologia Agrícola da UFBA, envolvia quase que exclusivamente pragas agrícolas e seus inimigos naturais. Nesta ocasião (1992 a 1999) se destacaram os estudos sobre o efeito dos extratos de pimenta do reino e cinamomo e do malatiom no controle de *Zabrotes subfasciatus* Boheman, 1833 em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas; a avaliação da infestação natural de cultivares de batata-doce, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. por brocas-da-rama (Lepidoptera, Pyralidae) no Recôncavo Baiano; o consumo de *Orthezia praelonga* Douglas, 1891 (Insecta: Ortheziidae) por *Oxystyla pulchella* Spix, 1827 (Gastropoda: Bulimulidae) em laboratório; a associação de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) com a meleira do mamoeiro (*Carica papaya* L.), entre outros. Alguns desses projetos foram desenvolvidos em parceria com pesquisadores de outras instituições, especialmente da Embrapa Mandioca e Fruticultura, entre eles o Dr. Antônio Souza do Nascimento e o Dr. Nilton Sanches. Ainda neste período se intensificaram os projetos com os estudos sobre vespas sociais, como: levantamentos das espécies de vespas sociais (Hymenoptera, Vespidae), hábitos de nidificação, fenologia, raio de vôo e seletividade de inseticidas à vespas sociais. Dentre as espécies mais estudada se encontra à vespa social predadora *Polistes canadensis canadensis* (L., 1758), comum na região do Recôncavo Baiano na ocasião. Um destaque desses estudos foi a publicação do título: Vespas sociais e suas características e importância em agroecossistemas. O GPI continua firme rumo aos seus 30 anos de atividade.

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 no estudo dos insetos, seus produtos ou nas 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 EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERMELHA POR DIFERENTES MÉTODOS, uma importante contribuição para os interessados nesse tipo de própolis, que possui características físico-químicas muito específicas e de interesse biotecnológico relevante.

Conselho Editorial

EXTRAÇÃO DE PROPOLIS VERMELHA POR DIFERENTES MÉTODOS

Yzila Liziane Farias Maia de Araujo^{1*}, Lucyana Santos de Mendonça², Sara Cuadros Orellana³, Geni da Silva Sodré⁴, Carlos Alfredo Lopes de Carvalho⁴ & Edilson Divino de Araujo¹

1 Docente da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju-SE;

2 Pesquisadora do Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe, ITPS, Aracaju-SE;

3 Docente da Universidad Católica del Maule, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Talca-Chile

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

* Autor correspondente

Própolis é uma resina natural extraída de vegetais e modificada pelas abelhas melíferas (VARGAS et al., 2004). Esta resina tem variações quanto a sua coloração e sua consistência, dependendo de qual parte da planta foi coletada, podendo ser de botões florais, brotos ou ainda de exsudatos do vegetal (PARK et al., 1998). Trata-se de um antibiótico natural muito utilizado na medicina tradicional desde a antiguidade, tendo seu uso relatado 1700 a.C no Egito como cera negra servindo para embalsamar cadáveres (PEREIRA et al., 2002).

A composição das própolis varia principalmente devido às condições ambientais, origem botânica, características genéticas da abelha e localização (KUMAZAWA et al., 2004). A espécie ou mesmo a linhagem de abelha utilizada pode influenciar a qualidade da própolis. Porém, fatores não-biológicos, como a técnica de extração, metodologia de condução de ensaios e época do ano em que foi produzida a própolis, também podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (BANKOVA et al., 2000).

Park et al. (2000) classificaram as própolis brasileiras em doze tipos, analisando características físico-químicas e propriedades biológicas de amostras coletadas em diferentes regiões brasileiras. Foram encontrados cinco tipos de própolis na região sul (grupo 1, 2, 3, 4 e 5), seis grupos na região nordeste (grupo 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e um grupo na região sudeste (grupo 12) (PARK et al., 2000). Dausch (2007), reportou um novo tipo de própolis de coloração vermelha, de colmeias encontradas ao longo da praia e dos rios do nordeste do Brasil, foi classificada como própolis do grupo 13 de acordo com as características físico-químicas e biológicas diferenciais que levaram ao grande interesse mundial por essa variedade de própolis. A principal origem botânica desta própolis é a planta *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio, encontrada em áreas de restinga e manguezais do Nordeste do Brasil (SILVA et al., 2007).

O extrato de própolis vermelha pode ser obtido a partir de diversos métodos de extração e nesse estudo tivemos como objetivo a extração por três métodos, usando como parâmetro o teste de sensibilidade antimicrobiana.

Preparo do extrato bruto hidroalcólico de própolis vermelha (EBHP).

Para esse estudo foi realizado a extração de amostras de própolis vermelha do estado de Sergipe pelos métodos do banho-maria, maceração a frio e Soxhlet em diferentes tempos de análise. Em todas as extrações utilizou-se 1g de própolis e 12,5 mL de etanol a 70%.

Todos os EBHP obtidos ao final do processamento de cada extração foram filtrados, centrifugados numa rotação de 2.000 g por 15 minutos e secos em capela de exaustão para eliminação do solvente e em seguida em dessecador com sílica ativada para obtenção do extrato seco. O passo-a-passo será descrito logo abaixo:

Extração em banho-maria

1º Passo: realizar a triagem e limpeza de sujidades na própolis e logo em seguida realizar a maceração com grau e pistilo.

2º Passo: pesar a própolis e colocar em tubo Falcon com 12,5mL de etanol a 70%. Em seguida colocar o tubo no equipamento de banho-maria a 70°C pelo tempo escolhido (nesse estudo foi extraído por 2 horas).

3º Passo: realizar a centrifugação por 15 minutos a 2000 rpm e posteriormente filtrar com ajuda de um funil de vidro com papel filtro em seu interior. O sobrenadante deve ser dispensado na placa de Petri previamente pesada para obtenção fidedigna dos cálculos de massa seca (rendimento).

4º Passo: a placa de Petri com o extrato bruto deve ser deixada em capela de exaustão para volatilização completa do solvente (cerca de 1 a dois dias, a depender do fluxo de ar da capela, do diâmetro da placa e do volume de extrato) e em seguida colocada num dessecador com sílica ativada para perda de água total e obtenção do extrato seco.

5º Passo: a placa deve ser pesada a cada 2 horas até obtenção do peso constante do extrato seco. Após obter um valor constante, deve ser realizado o cálculo do rendimento:

Rendimento (R) = Peso final da placa de Petri (pf) - Peso inicial da placa de Petri (pi).

6º Passo: O extrato seco poderá ser retirado da placa com auxílio de micro espátula com formato espátula/colher nas suas extremidades ou outro item que melhor auxilie no processo. Esse extrato seco deve ser colocado em um Eppendorf de 1,5 ou 2,0 mL para facilitar o processo de ressuspender o extrato numa concentração conhecida. Assim como a placa de Petri, o Eppendorf deve ser pesado previamente para fins de cálculo exato.

7º Passo: no caso de não conseguir fazer a raspagem completa da placa, pode ser utilizado o mesmo solvente da extração com auxílio de uma micropipeta e retornar para o 4º Passo.

8º Passo: com o extrato seco da própolis pronto é o momento de ressuspender na concentração e no solvente desejado para suas análises.

Um esquema dos passos acima é observado no fluxograma da Figura 1.



Figura 1. Fluxograma da extração da própolis vermelha em banho-maria.

Extração pelo método de maceração a frio

1º Passo: realizar a triagem e limpeza de sujidades na própolis e logo em seguida realizar a maceração com grau e pistilo.

2º Passo: pesar a própolis e colocar em tubo Falcon com 12,5mL de etanol a 70%. Envolver o tubo em papel alumínio para proteger a solução dos efeitos da luz e armazenar em local escuro e temperatura ambiente (nesse estudo foi extraído por 4h).

3º Passo: realizar a centrifugação por 15 minutos a 2000 rpm e posteriormente filtrar com ajuda de um funil de vidro com papel filtro em seu interior. O sobrenadante deve ser dispensado na placa de Petri previamente pesada para obtenção fidedigna dos cálculos de massa seca (rendimento).

4º Passo: a placa de Petri com o extrato bruto será deixada em capela de exaustão para volatilização completa do solvente (cerca de 1 a dois dias, a depender do fluxo de ar da capela, do diâmetro da placa e do volume de extrato) e em seguida colocada num dessecador com sílica ativada para perda de água total e obtenção do extrato seco.

5º Passo: a placa deve ser pesada a cada 2 horas até obtenção do peso constante do extrato seco. Após obter um valor constante, deve ser realizado o cálculo do rendimento:

$$\text{Rendimento (R)} = \text{Peso final da placa de Petri (pf)} - \text{Peso inicial da placa de Petri (pi)}.$$

6º Passo: O extrato seco poderá ser retirado da placa com auxílio de micro espátula com formato espátula/colher nas suas extremidades ou outro item que melhor auxilie no processo.

Esse extrato seco deverá ser colocado em um Eppendorf de 1,5 ou 2,0 mL para facilitar o processo de ressuspender o extrato numa concentração conhecida. Assim como a placa de Petri, o Eppendorf deve ser pesado previamente para fins de cálculo exato.

7º Passo: no caso de não conseguir fazer a raspagem completa da placa, pode ser utilizado o mesmo solvente da extração com auxílio de uma micropipeta e retornar para o 4º Passo.

8º Passo: com o extrato seco da própolis pronto é o momento de ressuspender na concentração e no solvente desejado para suas análises.

Os passos acima são observados no fluxograma da Figura 2.



Figura 2. Fluxograma da extração da própolis vermelha por maceração a frio.

Extração em Soxhlet

1º Passo: pesar a própolis e colocar no papel filtro e fazer um sachê antes do processo de extração. A amostra deve ficar no centro do papel filtro e ele deve ser bem lacrado com cordão para evitar que a amostra saia do papel durante o processo de extração. O sachê deve ser inserido na corneta (parte média do equipamento).

2º Passo: colocar no balão volumétrico (parte inferior do equipamento) 150 mL do solvente desejado para extração. Conferir se o equipamento está ligado na tubulação de água que fará a passagem pelo tubo condensador (parte superior do equipamento). A temperatura usada é de 30 °C constante.

2º Passo: ligar o aparelho Soxhlet e deixar a extração ocorrer pelo tempo determinado. (nesse estudo foi utilizado o tempo de 2 horas). Aguardar esfriar e retirar o balão volumétrico contendo o extrato e transferir o volume para tubos Falcon.

3º Passo: realizar a centrifugação do extrato obtido no balão por 15 minutos a 2000 rpm e posteriormente filtrar com ajuda de um funil de vidro com papel filtro em seu interior. Pode

transportar o volume do balão para tubos Falcon para facilitar o processo de centrifugação. Após centrifugar, o sobrenadante deve ser dispensado na placa de Petri previamente pesada para obtenção fidedigna dos cálculos de massa seca (rendimento).

4º Passo: a placa de Petri com o extrato bruto deve ser deixada em capela de exaustão para volatilização completa do solvente (cerca de 1 a dois dias, a depender do fluxo de ar da capela, do diâmetro da placa e do volume de extrato) e em seguida colocada num dessecador com sílica ativada para perda de água total e obtenção do extrato seco.

5º Passo: a placa deve ser pesada a cada 2 horas até obtenção do peso constante do extrato seco. Após obter um valor constante, deve ser realizado o cálculo do rendimento:

$$\text{Rendimento (R)} = \text{Peso final da placa de Petri (pf)} - \text{Peso inicial da placa de Petri (pi)}.$$

6º Passo: O extrato seco poderá ser retirado da placa com auxílio de micro espátula com formato espátula/colher nas suas extremidades ou outro item que melhor auxilie no processo. Esse extrato seco deverá ser colocado em um Eppendorf de 1,5 ou 2,0 mL para facilitar o processo de ressuspender o extrato numa concentração conhecida. Assim como a placa de Petri, o Eppendorf deve ser pesado previamente para fins de cálculo exato.

7º Passo: no caso de não conseguir fazer a raspagem completa da placa, pode ser utilizado o mesmo solvente da extração com auxílio de uma micropipeta e retornar para o 4º Passo.

8º Passo: com o extrato seco da própolis pronto é o momento de ressuspender na concentração e no solvente desejado para suas análises.

Os passos acima são observados no fluxograma da Figura 3.



Figura 3. Fluxograma da extração da própolis vermelha por soxhlet.

Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) do extrato hidroalcolólico da própolis vermelha

A avaliação da atividade antimicrobiana da própolis vermelha pode ser realizada pela técnica de poços descrita a seguir. Após a aplicação do inoculo na placa de Petri, devem ser marcados poços equidistantes de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro em cada placa com pipeta de vidro Pasteur estéril, e com o auxílio de uma bomba de vácuo os poços serão succionados usando uma ponteira de polipropileno estéril cortada e acoplada à extremidade de uma mangueira. Todo o procedimento deve ser realizado em uma capela de fluxo laminar, de acordo com a Figura 4.



Figura 4. Procedimento de preparo dos poços.

Alíquotas de 15 μ L de cada extrato ressuspendido no solvente desejado podem ser aplicadas nos poços e em seguida as placas devem ser incubadas nas condições ideais para cada microrganismo testado, sendo 24 horas a 36 °C para as bactérias, e 48 horas a 35 °C para a levedura.

O teste de sensibilidade antimicrobiana pode ser realizado em triplicata e os resultados devem ser observados pela formação de halos de inibição, sendo tomadas as medidas com auxílio de um paquímetro digital. Maia-Araujo (2009) avaliou os resultados de extração obtidos dos diferentes métodos de extração de própolis vermelha abordados nesse boletim.

Agradecimentos

Aos Consultores *ad hoc* pelas contribuições no texto final. Ao CNPq pela Bolsa PQ concedida à CALC.

Referências Bibliográficas

- BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.D. e MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.
- DAUSCH, A. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP/SP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.
- 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, p.3-7, 2000.
- 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.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, n.3, p.329-339, 2004.
- MAIA-ARAUJO, Y.L. F. **Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da foz do Rio São Francisco**. Aracaju, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. Dissertação de Mestrado, Universidade Tiradentes, Aracaju. 104p, 2009.
- PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S; NETO, F.R.A. Própolis: 100 Anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n.2, p.321-326, 2002.
- SILVA, B.B; ROSALEN, P.L; CURY, J.A; IKEGAKI, M; SOUZA, C; ESTEVES, A; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, p.313-316, 2007.
- VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, p.159-163, 2004.



**Boletim Técnico-Científico
Insecta, v.1, n. 3, 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