

## Avaliação da atividade antimicrobiana da geoprópolis de abelhas nativas da região de Ponta Grossa

### Evaluation of the Antimicrobial Activity of geopropolis from native bees in the Ponta Grossa region

Luan Felipe da Silva Calixto<sup>1</sup>, Maria Carolina de Oliveira Ribeiro<sup>2</sup>, Simone Bowles<sup>3</sup>

#### RESUMO

Antes da introdução de abelhas exóticas, no Brasil, já existiam abelhas nativas sem ferrão, denominadas como melíponas. Esse gênero é conhecido pela produção da geoprópolis, um produto semelhante à própolis de abelha africana, se diferenciando pela presença de terra e/ou barro. A geoprópolis é usada pela medicina popular para tratar diversas doenças, porém seu potencial antimicrobiano ainda é pouco estudado. Este estudo teve por objetivo avaliar a capacidade antimicrobiana da geoprópolis em diferentes concentrações frente à bactérias patogênicas. Foram utilizados extratos em concentrações de 5%, 10% e 30%, testando sua capacidade inibitória por meio do método de disco-difusão frente à quatro espécies de bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Os resultados indicaram que os extratos de 10% e 30% apresentaram níveis semelhantes de inibição frente à todas as bactérias testadas, enquanto o extrato de 5% foi menos eficaz apenas contra *Pseudomonas aeruginosa*. Isso sugere que os extratos mantêm suas propriedades antimicrobianas mesmo em concentrações menores.

**PALAVRAS-CHAVE:** abelha sem ferrão; disco-difusão; extrato hidroalcoólico.

#### ABSTRACT

Before the introduction of exotic bees in Brazil, native stingless bees known as meliponas already existed. This genus is renowned for producing geopropolis, a substance similar to African honeybee propolis but distinguished by the presence of soil and/or clay. Geopropolis has been used in traditional medicine to treat various ailments, yet its antimicrobial potential remains understudied. This study aimed to assess the antimicrobial activity of geopropolis at different concentrations against pathogenic bacteria. Hydroalcoholic extracts at concentrations of 5%, 10%, and 30% were prepared, and their inhibitory potential was tested using the disk diffusion method against four species of pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. The results indicated that the 10% and 30% extracts exhibited statistically similar levels of inhibition against all tested bacteria, while the 5% extract was less effective only against *Pseudomonas aeruginosa*. This suggests that the extracts retain their antimicrobial properties even at lower concentrations.

**KEYWORDS:** stingless bees; disc-diffusion; Hydroalcoholic extract.

#### INTRODUÇÃO

Durante o período colonial, missionários e colonizadores europeus introduziram nas Américas, abelhas da espécie *Apis mellifera*, as abelhas com ferrão. Porém, antes da chegada das espécies exóticas, já havia no Brasil espécies nativas de abelhas, as

<sup>1</sup> Voluntário de Iniciação Científica e Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: luancalixto@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 4604630226786112.

<sup>2</sup> Docente de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: carolina@utfpr.edu.br. ID Lattes: 3261695828340553

<sup>3</sup> Docente de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. E-mail: simonebowles@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1934078557424575.

abelhas sem ferrão, denominadas de “abelhas indígenas” ou meliponíneos (TORRES e ALVES JUNIOR, 2023). Essas espécies foram há muito tempo domesticadas por povos originários das Américas, os quais através de manejos rudimentares e extrativistas coletavam delas seus produtos, como mel, ceras e geoprópolis.

Segundo Manta (2022), a geoprópolis é produzida exclusivamente por abelhas nativas, porém, sua composição se assemelha à da própolis de espécies de abelhas exóticas, sendo composta de pólen, resina, exsudatos de vegetais e enzimas salivares, se diferenciando pela adição de terra ou barro. Também desempenha, na colméia, a mesma função que a própolis: reparar, impermeabilizar e proteger contra microrganismos devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas. Sua composição química varia de acordo com fatores ambientais, climáticos, geográficos e com a ecologia da flora local (FERREIRA, 2018).

Por suas conhecidas propriedades medicinais, como ação anti-inflamatória, antiviral e antibacteriana, a geoprópolis foi incorporada pela medicina popular para o tratamento de diversas doenças (FERREIRA, 2018). A criação de meliponíneos para a obtenção de produtos é denominada meliponicultura. Apesar da escassez de informações sobre a produção e coleta da geoprópolis, sabe-se que se trata de um manejo delicado que envolve diversos fatores internos e externos às colônias, como condições específicas para a produção. Apesar disso, a produtividade de geoprópolis por meliponíneos é em média o dobro da de própolis pela *Apis mellifera*, segundo constata Alves *et al.* (2011).

Com propriedades antimicrobianas ainda pouco estudadas, este trabalho objetiva avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do extrato de geoprópolis da região de Ponta Grossa frente à bactérias patogênicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos testes foram coletadas amostras de geoprópolis na primavera de 2022, no Meliponário São Miguel, localizado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. A amostra foi armazenada em recipiente hermético, à -10 °C, em local escuro.

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos as amostras foram inicialmente maceradas manualmente e quarteadas.

Os extratos foram preparados nas concentrações de 5%, 10% e 30% (p/v), diluindo a geoprópolis em etanol a 70% (v/v). Para a completa dissolução, as soluções foram mantidas em banho de ultrassom a 26 °C por 30 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada em papel filtro e depois esterilizada em microfiltro de 0,45 µm e então armazenada em frascos âmbar de 50 mL estéreis, conforme descrito por Manta (2022). Seguindo as orientações de Frazão (2017), os frascos foram armazenados a -20 °C.

As cepas utilizadas foram cedidas pela Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico da UTFPR/Ponta Grossa e foram escolhidas por serem patógenos comumente encontrados em superfícies, sendo elas: *Staphylococcus aureus* CMIB 057, *Salmonella choleraesuis* CMIB 110, *Pseudomonas aeruginosa* CMIB 103 e *Escherichia coli* CMIB 090. Dentre estas, a *Staphylococcus aureus* e a *Salmonella choleraesuis* são microrganismos empregados para avaliação da ação antimicrobiana segundo a

Resolução nº 693, de 13 de maio de 2022 da ANVISA que dispõe sobre as condições para registro de produtos saneantes com ação antimicrobiana.

Seguindo a norma M07-A9 vol. 32 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico”, 9º ed. do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) de janeiro de 2012, os microrganismos foram reativados em ágar TSA e incubados por 24 horas a  $37 \pm 2$  °C, foram preparados os inóculos bacterianos em solução salina estéril a 0,85% até atingir o ponto 0,5 da escala McFarland, a fim de padronizar a concentração microbiana em suspensão de aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL.

Os testes de sensibilidade antimicrobiana por disco-difusão seguiram uma adaptação da norma M02-A11 vol. 32 nº1 da “*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*” 7º ed. do CLSI.

O inóculo bacteriano, com o auxílio de um *swab* estéril, foi espalhado uniformemente sobre placas de Petri contendo o meio de cultura. Após o inóculo ser totalmente absorvido, foram depositados sobre a placa inoculada, discos de papel filtro com 6 milímetros de diâmetro e poros de aproximadamente 28 µm. Em seguida, utilizando uma micropipeta, os discos foram embebidos com um volume padrão de 6 µL dos extratos hidroalcoólicos. O procedimento foi realizado em triplicata para cada concentração do extrato. As placas foram incubadas a 37 °C, e após 48 horas os halos de inibição foram medidos em milímetros.

Foram realizados testes com etanol a 70% a fim de averiguar se havia influência do mesmo na formação dos halos de inibição.

Por fim, com o objetivo de comparar as inibições dos extratos com a de antibióticos, foram realizados testes de antibiograma com os mesmos microrganismos, utilizando antibióticos com potencial inibitório para cada um, e dentro da concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com a norma M100-S15 vol 25 nº1 do CLSI, como mostra o quadro 1.

**Quadro 1 – Antibióticos utilizados para cada microrganismo e suas concentrações**

Bactéria	Antibiótico	Concentração
<i>Staphylococcus aureus</i>	Norfloxacina	10 µg
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Norfloxacina	10 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ciprofloxacina	5 µg
<i>Escherichia coli</i>	Fosfomicina	200 µg

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os resultados obtidos passaram por tratamento estatístico. Utilizando o *software* Excel, foi realizado o teste Q com 95% de confiança a fim de descartar possíveis valores críticos e então, com valores aceitos, foram calculados a média e o desvio padrão. Após,

os dados obtidos foram comparados entre si usando Teste de Tukey com 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a interpretação dos diâmetros dos halos de inibição foi utilizada a mesma norma M100-S15 vol 25 nº1 do CLSI que relaciona medidas mínimas de inibição de determinado antibiótico sobre um microrganismo para evidenciar se o mesmo é sensível ou resistente. Os resultados estão expressos na Tabela 1.

Comparando as informações do documento com os resultados obtidos, é possível observar que todas as cepas testadas se mostraram sensíveis frente ao antibiótico proposto. Os testes apresentaram halos de inibição com efeito bactericida, ou seja, quando o microrganismo não apresenta nenhum crescimento na região de inibição.

Tabela 1 – Inibição das diferentes concentrações de extratos de geoprópolis (em mm)

Bactéria	Antibiótico	5%	10%	30%
<i>Staphylococcus aureus</i>	33,80 ± 3,50 <sup>a</sup>	10,20 ± 1,20 <sup>b</sup>	12,20 ± 2,30 <sup>b</sup>	10,30 ± 2,20 <sup>b</sup>
<i>Salmonella choleraesuis</i>	21,30 ± 0,60 <sup>a</sup>	9,80 ± 1,60 <sup>b</sup>	13,80 ± 3,00 <sup>b</sup>	12,40 ± 2,00 <sup>b</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,70 ± 1,60 <sup>c</sup>	12,1 ± 3,30 <sup>b</sup>	12,5 ± 0,35 <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i>	23,80 ± 0,80 <sup>a</sup>	9,30 ± 0,40 <sup>b</sup>	11,4 ± 2,30 <sup>b</sup>	11,50 ± 0,30 <sup>b</sup>

\*As letras diferentes na linha, houve diferença significativa.

Fonte: Autoria própria (2023).

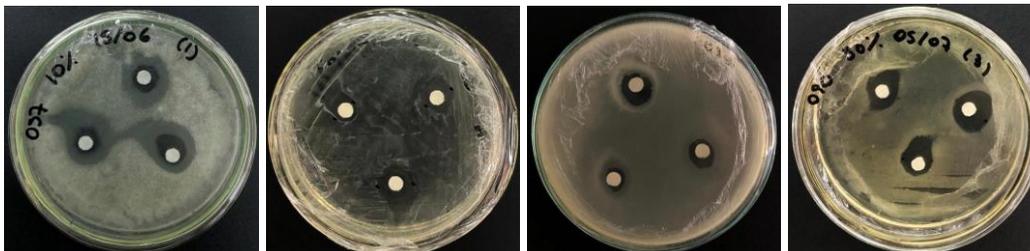
O extrato com maior média de inibição frente à uma bactéria foi o de 10% sobre a *Salmonella choleraesuis* CMIB 110, com 13,80 mm, o que representa 64,79% do diâmetro de inibição formado pelo antibiótico ao qual a bactéria é sensível, essa foi a maior porcentagem de inibição da geoprópolis em relação ao antibiótico. Logo após vem a *Escherichia coli* CMIB 090 com 48,32% de inibição do extrato de 30% em comparação ao antibiótico, seguida da *Staphylococcus aureus* CMIB 057 com o extrato de 10% e 36,10% de inibição, e por fim a *Pseudomonas aeruginosa* CMIB 103 com o extrato de 30% formando uma inibição de 32,90% do diâmetro do respectivo antibiótico. Isso demonstra o potencial inibitório da geoprópolis em relação ao potencial de outros agentes antimicrobianos, como os antibióticos. As Imagens 1 e 2 demonstram a formação dos halos em placas.

Imagem 1 – Halos de inibição dos antibióticos



Da esquerda para a direita: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.  
Fonte: Autoria própria (2023).

Imagem 2 – Halos dos extratos com maiores médias de inibição



Da esquerda para a direita: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.  
Fonte: Autoria própria (2023).

Para a comparação dos resultados entre cada um dos extratos, o teste de Tukey, demonstrou uma semelhança estatística entre as medidas. Com exceção do extrato de 5% frente à *Pseudomonas aeruginosa* CMIB 103, todos apresentaram semelhança, isso significa que apesar de numericamente distintos, o potencial dos três extratos é estatisticamente semelhante. Esse fato possibilita utilizar os extratos em concentrações menores e mesmo assim atingirem os mesmos potenciais de inibição.

Os testes com álcool 70% apresentaram resultado negativo para a sensibilidade das cepas. Infere-se assim que o álcool presente nos extratos não influencia nos resultados.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados foi possível concluir que a geoprópolis apresenta potencial inibitório frente às quatro cepas testadas, e que dentre as diferentes concentrações, o extrato de 10% sobre a *Salmonella choleraesuis* CMIB 110 apresentou um percentual de inibição considerável comparado ao potencial do antibiótico específico.

Além disso, as análises estatísticas apontam que os extratos de 10% e 30% apresentaram potenciais de inibição estatisticamente semelhantes frente às quatro espécies testadas, enquanto que a solução de 5% apresenta um menor potencial apenas frente à *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que os extratos mantêm suas propriedades mesmo em concentrações menores.

## Agradecimentos

Agradeço à UTFPR pelo local de ensino e pesquisa, ao Meliponário São Miguel pela doação da geoprópolis e à Coleção Microbiológica de Interesse Biotecnológico por ceder as cepas utilizadas.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

ALVES, R. M. de O. et al. **AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE COLETA DE GEOPRÓPOLIS EM COLÔNIAS DE MANDAÇAIA (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier)**. Cruz das Almas, 2011. Acesso em: 09 set. 2023.

BRASIL, **RDC nº 693, de 13 de maio de 2022**. Dispõe sobre as condições para registro de produtos saneantes com ação antimicrobiana. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 mai. 2022. Acesso em: 12 set. 2023.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. Acesso em: 12 set. 2023.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition**. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. Acesso em: 12 set. 2023.

CLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. Acesso em: 12 set. 2023.

FERREIRA, B. L. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA GEOPRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS SEM FERRÃO NO ESTADO DE SANTA CATARINA**. Florianópolis, 2018. Acesso em: 3 set. 2023.

FRAZÃO, J. S. **DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES COSMÉTICAS UTILIZANDO PRODUTOS APÍCOLAS E VOLÁTEIS DE COGUMELOS SILVESTRES: DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE E TOXICIDADE**. Bragança, 2017. Acesso em: 12 set. 2023.

MANTA, V. G. **AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GEOPRÓPOLIS DE *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* FRENTE À BACTÉRIAS DA MICROBIOTA CUTÂNEA**. Ponta Grossa, 2022. Acesso em: 10 set. 2023.

TORRES, A. M.; ALVES JUNIOR, V. V. Análise quantitativa da abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 na Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 10030–10043, 2023. DOI: 10.55905/oelv21n8-118. Acesso em: 9 set. 2023.