

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS CONTRA ALGUMAS BACTÉRIAS COMUNS EM CONTAMINAÇÃO DE CARNE

*Alves, H. C.^{1,2,3}, Martins, J. T.¹, Bernardes-Filho, R.², Sousa, C. P.³, Teixeira, J. A.¹, Vicente, A. A.¹

¹Universidade do Minho, Depto. de Engenharia Biológica, Braga, Portugal. ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. ³Universidade Federal de São Carlos – Depto. de Morfologia e Patologia, São Carlos, SP.

*henrique.biotec@gmail.com

Classificação: Novos Materiais e Processos em Nanotecnologia e suas Aplicações no Agronegócio

Resumo

Própolis é uma substância resinosa natural coletada em botões foliares de diferentes espécies de árvores por abelhas e conhecida por suas propriedades biológicas (antibacteriana, antifúngica e antioxidante). O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de própolis (NPs) em comparação com extrato etanólico de própolis (EEP) contra algumas bactérias (*Escherichia coli* was 1.15%, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thompson*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter helveticus*, *Lactobacillus buchneri* and *Leuconostoc mesenteroides*) comuns em contaminação de carne. O EEP foi obtido de resina de própolis verde, em etanol absoluto sob agitação durante 15 dias. Para obter as NPs, EEP a 13,75% (m/V) foi misturado com solução de álcool polivinílico a 0,1% (m/V). Concentração inibitória mínima (CIM) de ambas as soluções foi avaliada pelo método de difusão por poços em ágar; todas as linhagens foram suscetíveis e os valores da CIM, para as NPs, variaram entre 0,57, para *S. aureus* e 2,29% (m/V) para *S. thompson*, *E. helveticus* e *L. buchneri*. Para o EEP, a CIM variou de 0,68, para *S. aureus*, a 6,88% (m/V) para *E. helveticus* e *L. buchneri*. A atividade antimicrobiana apresentada pelas NPs é de potencial interesse para aplicações em produtos cárneos (por exemplo, na formulação de revestimentos comestíveis).

Palavras-chave: Própolis; Nanopartículas; Antimicrobianas; Carne; Bactérias;

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS NANOPARTICLES AGAINST SOME COMMON MEAT CONTAMINATION BACTERIA

Abstract

Propolis is a natural resinous substance collected from the leaf buds of different tree species by honeybees and known for its biological properties (antibacterial, antifungal and antioxidant). The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of propolis nanoparticles (PNs) in comparison with ethanol-propolis extract (EPE) against some bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thompson*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter helveticus*, *Lactobacillus buchneri* and *Leuconostoc mesenteroides*) common in meat contamination. The EPE was obtained from green propolis resin, in absolute ethanol under agitation during 15 days. To obtain the PNs, ethanol extract at 13.75% (w/V) was mixed with polyvinyl-alcohol solution at 0.1% (w/v). Minimum inhibitory concentrations (MIC) of both solutions were evaluated by agar-well diffusion method; all strains were susceptible and MIC values, for PNs, ranged from 0.57, for *S. aureus*, to 2.29% (w/v) for *S. thompson*, *E. helveticus* and *L. buchneri*. For EPE, the MIC ranged from 0.68, for *S. aureus*, to 6.88% (w/v) for *Enterobacter helveticus* and *Lactobacillus buchneri*. The shown antimicrobial activity of propolis nanoparticles is of potential interest for meat products (e.g. in edible coatings formulation).

Keywords: Propolis; Nanoparticles; Antimicrobial; Meat; Bacterias;

Publicações relacionadas: PORTUGUESE CONGRESS OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY - MicroBiotec '13 6th – 8th December | Aveiro Portugal.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de antibióticos naturais, para a conservação de alimentos é uma tendência de mercado, haja vista que o consumidor moderno tende a exigir um alimento que preserve ao máximo as suas características originais e isento de produtos sintéticos, para que se atinja este objetivo (Vaithyanathan *et al.*, 2011; Economou *et al.*, 2009; Dutta *et al.*, 2009; Chouliara *et al.*, 2007). Um produto que possui

estas características é a própolis, milenarmente reconhecida por ser um antibiótico natural produzido por abelhas, para a assepsia de suas colmeias (Koo, 2000).

Um dos principais fatores que influenciam o rápido crescimento microbiano em carnes é a sua composição: 75% de água, consequentemente água livre e principalmente a presença de muitos nutrientes como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e açúcares (Lawrie, 1985).

Com o advento da nanotecnologia, possibilitou a utilização de quantidades reduzidas de um determinado produto, obtendo-se resultados mais satisfatórios, em virtude do aumento da superfície de contato da partícula com o material em questão, neste caso as bactérias. Sendo assim, neste trabalho, nanopartículas de própolis foram testadas, para se comparar a eficiência em relação ao tradicional extrato de própolis, contra gêneros bacterianos comumente encontrados em carne bovina *in natura*.

2 OBJETIVOS

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de própolis (NPs);
Avaliar *in vitro* a eficiência, de NPs, na inibição do crescimento microbiano;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese e caracterização de nanopartículas de própolis

3.1.1 Extrato de própolis

Extrato etanólico de própolis (EEP) foi preparado, mediante a maceração de 12,75 g de própolis verde, em almofariz de ágata e posterior agitação em 100 mL de álcool etílico absoluto, durante 360 h.

3.1.2 Síntese de NPs

Cinco mL de uma solução de álcool polivinílico (PVA) a 0,1%, foram filtrados em membrana de *nylon* com diâmetro de poro de 0,22 μm . Em seguida, esta solução foi aquecida a 35° C e agitada a 600 rpm. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de EEP, preparado conforme descrição acima, também filtrado no mesmo tipo de membrana, obtendo-se as nanopartículas de própolis.

3.1.3 Caracterização de NPs

Foram depositados trinta microlitros de solução de nanopartículas em suspensão, em lâmina de mica e deixar secar em dessecador, contendo sílica desidratada, para determinar o tamanho das partículas obtidas, por meio de microscopia de força atômica (MFA).

O diâmetro médio de partículas de própolis em suspensão foi determinado pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL) utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano® da marca Malvern.

3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de EEP e NPs

Foi determinada a CIM para 8 espécies de bactérias de gêneros comumente presentes em amostras de carne, em especial, de carne embalada a vácuo. São elas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thompson*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter helveticus*, *Lactobacillus buchneri* and *Leuconostoc mesenteroides*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização de nanopartículas de própolis

Através de medições feitas pelo software Gwyddion (versão 2.31), em imagens obtidas por AFM, como na figura 1 (abaixo), pôde-se concluir que o tamanho mínimo das nanopartículas foi de aproximadamente 40 nm.

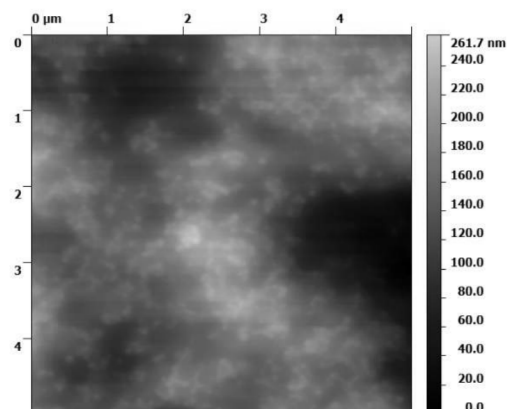


Figura 1. Imagem de nanopartículas de própolis, obtida por AFM.

Após medições do diâmetro médio de partículas pelo método de Espalhamento Dinâmico de Luz, percebeu-se que o tamanho médio das partículas foi 46,32 nm, o que é coerente com as medições feitas pelo método anterior. O resultado pode ser observado na figura 2, abaixo.

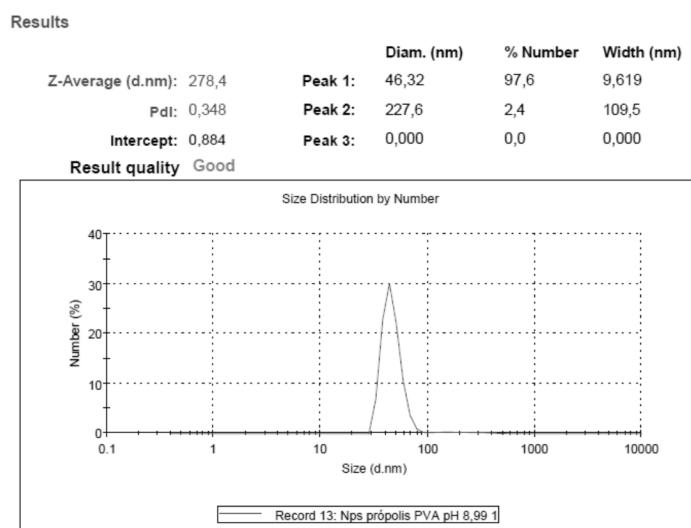


Figura 2. Determinação de diâmetro médio de nanopartículas de própolis, por DLS.

4.2 Determinação da CIM do extrato e das nanopartículas de própolis

Houve inibição de todas as espécies submetidas a bioensaio. Isto foi uma grata surpresa, em especial no caso das espécies gram-negativas, pois pela literatura é sabido que a própolis possui melhor efeito contra gram-positivas.

Tabela 1. CIM e média dos halos inibitórios de 8 gêneros microbianos comumente presentes em carne bovina.

Micro-organismo	Concentrações NPs (%)	Média – halos de inibição (mm)	Concentrações EEP (%)	Média – halos de inibição (mm)
<i>Enterobacter helveticus</i>	2.28	1.53	6.88	1.33
<i>Salmonella thompson</i>	2.28	1.73	3.44	2.33
<i>Escherichia coli</i>	1.15	1.60	3.44	1.87
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.71	1.67	3.44	1.93

Micro-organismo	Concentrações NPs (%)	Média – halos de inibição (mm)	Concentrações EEP (%)	Média – halos de inibição (mm)
<i>Lactobacillus buchneri</i>	2.28	1.47	6.88	1.60
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.71	0.90	3.44	0.67
<i>Enterococcus faecalis</i>	1.71	2.10	3.44	3.50
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.57	1.97	0.69	3.67

5 CONCLUSÃO

As NPs se mostraram mais eficazes que o EEP na inibição do crescimento das espécies bacterianas testadas neste trabalho. Em alguns casos a concentração necessária de nanopartículas de própolis necessárias para inibir o crescimento bacteriano foi inferior a 1/3 da concentração necessária quando se utilizou o estrato etanólico de própolis. Com isso, pode-se obter o mesmo resultado utilizando-se uma quantidade significativamente menor de própolis, o que reduz custos, além de reduzir o odor e o sabor produzido por esta substância, no caso de aplicação em alimentos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rejane Celi Goy e ao Dr. Humberto de Mello Brandão, por ensinarem a sintetizar as NPs. À profa. Dra. Olivia Pereira e à Dra. Carina Almeida, pelo auxílio nos bioensaios. À CAPES pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche concedidas.

REFERÊNCIAS

- Chouliara, E.; Karatapanis, A.; Savvaidis, I.N.; Kontominas, M.G. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4° C. Food Microbiology, v. 24, p. 607–617, 2007.
- Dutta, P.K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G.K.; Dutta, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry, v. 114, p 1173–1182, 2009.
- Economou, T.; Pournis, N.; Ntzimani, A.; Savvaidis, I.N. Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. Food Chemistry, v. 114 p.1470–1476, 2009.
- Koo, H.; Gomes, B.P.F.A.; Rosalen, P. L.; Ambrosano, G.M.B.; Park, Y. K.; Cury, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. Archives of Oral Biology, v. 45, p.141-148, 2000.
- Lawrie, R. A. Meat science. Oxford - Pergamon Press, v.4 p.44, 1985.
- Vaithyanathan, S.; Naveena, B.M.; Muthukumar, M.; Girish, P. S.; Kondaiah, N. Effect of dipping in pomegranate (*Punica granatum*) fruit juice phenolic solution on the shelf life of chicken meat under refrigerated storage (4 °C). Meat Science, v. 88, p. 409–414, 2011.