

FABRICAÇÃO DE PRODUTO A BASE DE PRÓPOLIS NO COMBATE A FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIOLÓGICO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

MANUFACTURE OF A PRODUCT BASED ON FIGHTING PROPOLIS BIOFILM FORMATION MICROBIOLOGICAL IN FOOD INDUSTRY

Juliana Matos Araujo¹; Manuella da Silva Carvalho²

¹Universidade Federal de Sergipe – UFS – São Cristóvão/SE – Brasil
Jmatos.zoo@gmail.com

²Universidade Federal de Sergipe – UFS – São Cristóvão/SE – Brasil
manu.carsilva@hotmail.com

Resumo

Muitas contaminações ocorrem em indústrias de diferentes tipos de alimentos. Grande parte destas contaminações está diretamente relacionada à formação de biofilmes dentro da linha de processamento, onde muitos microrganismos estão relacionados a este problema, causando graves riscos à saúde do consumidor e danos financeiros a indústria. Dentre os microrganismos que podem participar de processos de formação de biofilmes, estão: Pseudomonas aeruginosa, P. fragi, P. fluorescens, Micrococcus sp., Enterococcus faecium, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Salmonella thyphimurium, Escherichia coli O157:H7, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Alcaligenes e Flavobacterium. Diante disso faz-se necessário à fabricação de um detergente a base de extrato de própolis com a finalidade de combater a formação de biofilmes na indústria. A própolis foi escolhida, por apresenta propriedades anti-inflamatória, atividades antimicrobiana, antifúngico, além de possuir propriedades bacteriostática e mesmo bactericidas, diretamente proporcional a concentração da própolis. Dentre um espectro grande de microrganismo, a utilização do extrato de própolis foi comprovada a eficácia na inibição do crescimento das seguintes bactérias: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus spp, S. mutan, S. sanguis, S. sobrinus, Actinomyces Naeslundii, Candida Albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.

Palavras-chave: biofilme, própolis, alimento.

Abstract

Many contaminations occur in different types of food industries. Much of this contamination is directly related to the formation of biofilms within the processing line where many microorganisms are related to this problem, causing serious risks to consumer health and financial damage to the industry. Among the microorganisms that can participate in processes of biofilm formation, are: Pseudomonas aeruginosa, P. fragi, P. fluorescens, Micrococcus sp, Enterococcus faecium, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Salmonella typhimurium, Escherichia coli O157: H7, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Flavobacterium and Alcaligenes. Therefore it is necessary to manufacture a detergent -based propolis extract in order to combat the formation of biofilms in the industry. Propolis has been chosen, has anti - inflammatory properties antifungal, antimicrobial, and also has bacteriostatic and even bactericidal properties, directly proportional to the concentration of propolis. Among a wide spectrum of microorganisms, the use of propolis extract has been proven to be effective in inhibiting the growth of the following bacteria: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Enterococcus spp, S. mutant, S. sanguis, S. sobrinus, Actinomyces naeslundii, Candida albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.

Key-words: *biofilm, propolis, food.*

1. Introdução

Muitas contaminações ou recontaminações ocorrem em indústrias de diferentes tipos de alimentos. Grande parte destas contaminações está diretamente relacionada à formação de biofilmes dentro da linha de processamento, onde muitos microrganismos estão relacionados a este problema (HAUN, 2004).

Segundo Caixeta (2008), na indústria alimentícia, a adesão de microrganismos à superfície de equipamentos utilizados para o processamento de alimentos resulta em graves problemas, uma vez que o biofilme microbiano tem o potencial de atuar como fonte crônica de contaminação por patógenos que pode comprometer a qualidade do alimento e representar graves riscos à saúde do consumidor. Além disso, pode ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição da vida-de-prateleira dos produtos alimentícios (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005).

O biofilme pode ser formado por populações constituídas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, ou seja, quando o biofilme é composto por espécies diferentes, os produtos metabolizados por uma das espécies podem servir de suporte para o crescimento de outras, enquanto a adesão de algumas espécies pode fornecer ligantes que promovem a ligação de outras (CAIXETA, 2008).

2. Definição, estrutura e composição do biofilme e da própolis

O biofilme é uma massa de consistência gelatinosa, constituída de polissacarídeos e proteínas, onde estão aderidos micro-organismos e seus produtos. Desta forma, ficam protegidos da

ação de substâncias químicas e antimicrobianas, o que dificulta sua eliminação, pois o biofilme é muito mais resistente às defesas do hospedeiro do que a forma planctônica dos microorganismos. A presença do biofilme tem relação direta com o estado de infecções alimentares sendo que, quando patogênico, há liberação de produtos danosos e toxinas, causando assim danos à saúde do consumidor. Fatores relacionados com o hospedeiro também podem predispor o surgimento desta patologia, como pacientes que já se encontram doentes e fatores hormonais decorrentes da puberdade, gravidez e menopausa.

A análise da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração de morte mínima (CMM) é muito utilizada na área médica, alimentícia e veterinária com intuito de se verificar a dosagem mínima de antimicrobianos necessários para inibir ou erradicar cepas causadoras de infecções. Os testes da CIM e da CMM são ensaios padrões para verificar a susceptibilidade de células planctônicas a antibióticos. Devido à reprodutibilidade, os testes de CIM e CMM passaram a ser utilizados para auxiliar na definição de dosagem mínima de outros antimicrobianos, tais como conservantes necessários para preservação de produtos com água em sua composição.

A maioria dos estudos descreve as bactérias gram-negativas como as principais formadoras de biofilme, porém, sabe-se que as bactérias gram-positivas também estão presentes na composição do biofilme, sendo em alguns casos as responsáveis pelo problema. Em indústrias sucroalcooleiras mostram que os principais problemas são causados por bactérias gram-positivas produtoras de gomas, como por exemplo, a dextrana. (LUCCHESI, 2006).

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, podem-se ressaltar: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus sp.* e *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Alcaligenes* e *Flavobacterium* (CAIXETA, 2008; CAPELLETTI, 2006; LUCCHESI, 2006). Boari (2008) cita *Aeromonas hydrophila* também como uma importante produtora de biofilme.

No tocante a própolis é uma resina produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, que misturam substâncias coletadas a partir de várias partes da planta, com as secreções produzidas em seu organismo (Figura 1). Com a finalidade de proteger contra a invasão de insetos (CABRAL *et al.*, 2009).

A composição da própolis consiste basicamente de 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera (ácidos graxos), 10% de óleos voláteis e 5% de pólen e material orgânico entre outros. O principal componente responsável pelas propriedades biológicas da própolis pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, os flavonóides (PARK *et al.*, 1998).

Figura 1: Imagem da própolis extraída de uma caixa apícola.



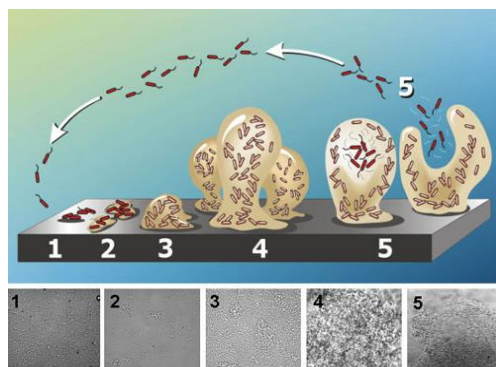
Fonte: http://www.sertho.com.br/materia_abelha_guarda_a_solucao.htm

2. Etapas da formação do biofilme e mecanismo de resistência a antimicrobiano

Segundo a American Society for Microbiology (2010), a formação do biofilme divide-se em cinco etapas consecutivas (FIGURA. 2). A etapa inicial, de adsorção reversível, ocorre em segundos, e nela predominam as forças fracas de atração. Em seguida, ocorre uma etapa de adesão irreversível, na qual predominam forças físicas e químicas, que duram de segundos a horas. Após esta etapa, ocorrem o crescimento e a divisão celular. Finalmente, a última etapa, ocorre a adesão de outros organismos e a liberação de micro-colônias microbianas (CHRISTENSEN e CHARACKLIS, 1990).

A matriz, além de aderir nutrientes, é muito hidratada, protegendo as células da desidratação. Todos esses fatores são vantajosos para as células presentes no biofilme, as quais são ditas sésseis, enquanto que as que estão livres são ditas planctônicas. Estas últimas estão mais susceptíveis às oscilações do seu ambiente próximo. Assim, movimentos bruscos nas massas líquidas podem afastar as células planctônicas dos nutrientes, o que dificilmente ocorre com as sésseis, aderidas nas interfaces sólido-líquido.

Figura 2. Etapas de crescimento do biofilme.



Fonte: www.otorrinotornu.com.ar/.../689-947-Biofilms%20

3. Mecanismo de ação da própolis como antimicrobiano

O principal destaque da própolis são as suas propriedades anti-inflamatórias, atividades antimicrobiana, antifúngico, além de possuir propriedades bacteriostática e mesmo bactericidas, diretamente proporcional a concentração da própolis. (Ghisalberti, 1979) (CABRAL *et al.*, 2009; VICTORINO *et al.*, 2009) (Quiroga *et al.*, 2006; Scazzocchio *et al.*, 2006). Tal efeito na atividade antimicrobiana já foi evidenciada em vários trabalhos frente a bactérias gram-positivas (FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2006; LUSTOSA *et al.*, 2008) e gram-negativas (BASTOS *et al.*, 2011; ORSI *et al.*, 2005; VICTORINO *et al.*, 2009)

O principal desafio do seu uso é a variação de sua composição de acordo com a flora, o tempo da coleta, condições sazonais e contaminantes. Fatores importantes para definir suas propriedades biológicas, químicas e físicas. Sendo esse o principal problema para definir qual tipo de própolis é indicada para cada uso medicinal (MARCUCCI, 1996).

4. Importância da inclusão da própolis em um produto para higienização

Dentre um espectro grande de microrganismo, a utilização do extrato de própolis foi comprovada a eficácia na inibição do crescimento das seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp*, *S. mutan*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *Actinomyces Naeslundii*, *Candida Albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Steinberg, 1996; Park *et al*, 1998; Panzeri *et al*, 1999; Zárate, 1999; Park *et al*, 2000).

Sabe-se da importância da higienização na indústria em geral, seja alimentícia, farmacêutica, laboratórios responsáveis por análises científicas, pensando nisso vários estudos foram sendo desenvolvidos acerca da inibição microbiologia com extrato de própolis.

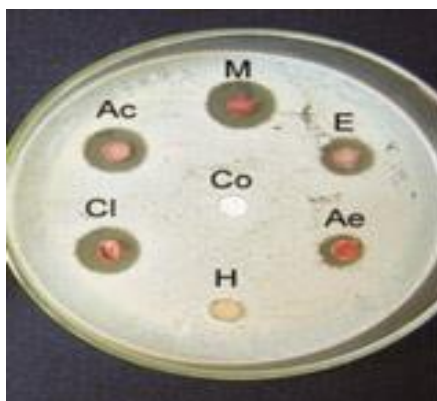
Uma das propostas seria a inclusão do extrato de própolis no detergente utilizado como sanitizante natural viável economicamente, visto que Moraes *et al.*, 2008, avaliou as quantidades de compostos fenólicos e flavonoides extraído das própolis, obtidos em diferentes concentrações de etanol (10-100%) e concentrações de (0-100%) de metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio e acetona.

O estudo obteve os seguintes resultados:

Apesar da própolis possuir grande quantidade de compostos fenólicos, a extração depende intensamente do solvente e da concentração do solvente utilizados; Destacou-se na própolis o acetato de etila, o clorofórmio, a acetona e concentrações etanólicas de 50-100%, que extraíram maiores quantidades de compostos fenólicos (Figura 3); Mostrou-se que a própolis tem atividade

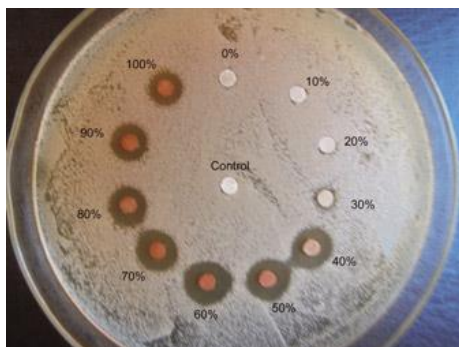
antimicrobiana que varia conforme a quantidade de compostos fenólicos extraídos, verificados na inibição de *Staphylococcus aureus* em diferentes intensidades, com maior intensidade de inibição para extratos com metanol, clorofórmio e acetona e em concentrações etanólicas entre 40-100%. (Figura 4).

Figura 3: Antibiograma de própolis com *Staphylococcus aureus*. obtidos com diferentes solventes. Co = controle, M = metanol, E = etanol, Ae = acetato de etila, H = hexano, Cl = clorofórmio e Ac = acetona.



Fonte: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/99/artigo.htm>

Figura 4: Antibiograma da própolis com *Staphylococcus aureus* obtidos em extrato aquoso e em diferentes concentrações etanólicas (10-100%).



Fonte: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/99/artigo.htm>

3. Conclusão

Obter um produto com qualidade e segurança é o que mais se preza na indústria de alimentos e as estratégias para a erradicação dos biofilmes devem ser consideradas. Para isso os biocidas são excelentes métodos a ser aplicados na remoção de biofilme, já que estes estão diretamente ligados as contaminações que ocorrem em produtos alimentares, comprometendo a saúde do consumidor, bem como acarretando prejuízos econômicos para a indústria.

Este estudo tem como proposta a elaboração de um detergente adicionado de extrato de própolis como um elemento a ser utilizado na higienização da indústria alimentícia, como ferramenta de controle.

Referências

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Disponível em <<http://www.asm.org.html>> acessada em maio de 2010;

BASTOS, E. M. A. F. Indicadores físicoquímicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 63, n. 5, p.1255- 1259, 2011;

BOARI, C. A. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. 2008. 80f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras;

CABRAL, I. S. R. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. Química Nova, Piracicaba, vol.32, n.6, p. 1523-1527, 2009;

CAIXETA, D. S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras;

CAIXETA, D. S. Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras;

CAPELLETTI, R. V. Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais. 2006. 81f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas;

CERI, H; OLSON, M. E; STREMIC, C; READ, K.R.R; MORCK, W; BURET, J. Clin. Microbiol., 37, 1771 (1999);

CERI, H; D; MORCK, W; OLSON, M. E. In *Disinfection, Sterilization and Preservation*; Block, S. S. (ed.), Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 5a ed., cap. 75 (2001);

CHAVES, L. C. D. Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável. 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga;

CHRISTENSEN, B.E; CHARACKLIS, W.G. In Biofilms, Characklis, W.G.; Marshall, K. C. eds. John Wiley and Sons: New York, 93 (1990);

FERNANDES JUNIOR, A. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. Cienc. Rural, Santa Maria, v. 36, n. 1, 2006;

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. Acta Scientiae Veterinariae, 33(3): 291-296, 2005;

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. 1.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 151-153p;

GHISALBERTI, E.L. Propolis; A review. Bee word, v.60, p. 59-84, 1979;

HAUN, M. A. D. Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens*. 2004. 71f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas;

LUCCHESI, E. G. Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas;

LUSTOSA, S. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Rev. bras. Farmacognosia, Recife, vol. 18, n.3, p. 447-454, 2008;

MACHADO, S. M. O. Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis. 2005. 113f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga;

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1996; 26:83-99;

MORAES, C.S; DOUGSCH, A; FORT, P; PARK, Y.K. Extrações de própolis vermelha do nordeste brasileiro em diferentes concentrações alcoólicas, com diferentes solventes e suas atividades contra *Staphylococcus aureus*. UNICAMP, 2008;

ORSI, R. O. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, Botucatu, vol. 11, n. 2, p. 109-116, 2005;

PANZERI, H; PEDRAZZI, V, OGASAWARA, M.S; ITO, I.Y; LARA, E.H.G; GABARRA, F.R. Um dentifríco experimental contendo própolis: avaliação física, microbiológica e clínica. Rev. ABO Nac. 1999; 7 (1): 26-30;

PARK Y.K; IKEGAKI, M; ALENCAR, S.M; WANG, H.K; BASTOW, K; COSENTINO, M. Determinação das Atividades Citotóxicas e Anti-HIV dos Extratos Etanólicos de Própolis Coletadas em Diferentes Regiões do Brasil. *Rev. Mensagem Doce* [periódico on line] 2000; (56). Disponível em [http:// www.mensagemdoce.com.br](http://www.mensagemdoce.com.br). [2013 SETr 21];

PARK, Y.K; IKEGAKI, M; ABREU, J.A.S; ALCICI, N.M.F. Estudo das preparações dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1998; 18 (3);

PEREIRA, Olívia Baptista de Oliveira. Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme. 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga;

QUIROGA, E.M; SAPIETRO, D.A; SOBERÓN, J.R; SGARIGLIA, M.A, VATTUONE, M.A. Própolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol* 2006; 101:103-10;

SCAZZOCCHIO, F; D'AURIA, F.D; ALESSANDRINI, D; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res* 2006; 161:327-33;

SHENG, X; TING, Y.P; PEHKONEN, S.O. *J. Colloid and Interface Sci.*, 310, 661 (2007);

VICTORINO, F. R. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. *Braz. J. Pharm. Sci.*, Bauru, vol. 45, n.4, p. 795-800, 2009;

ZÁRATE P.P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%, fluoreto de sódio a 0,2% e própolis 05% acrescida de fluoreto de sódio a 0,05% sobre níveis salivares de *Streptococcus* do grupo mutans em paciente cárie-ativos. (Tese de Doutorado); São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

Recebido: 23/04/2014

Aprovado: 19/02/2015