UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

PATRÍCIA DA SILVA MONTES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (IN VITRO) DE EXTRATOS ALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS VERDES COLETADAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

BRASÍLIA, DF

2020

PATRÍCIA DA SILVA MONTES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (IN VITRO) DE EXTRATOS ALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS VERDES COLETADAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientadora: Profa. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto

BRASÍLIA, DF

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM779a

Montes, Patricia da Silva
Avaliação da Atividade Antimicrobiana (in vitro) de Extratos alcoólicos de Própolis verdes coletadas de diferentes regiões do Brasil / Patricia da Silva Montes; orientador Daniela Castilho Orsi; co-orientador Lívia Cristina Lira de Sá Barreto. -- Brasília, 2020.
85 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2020.

1. Própolis verde. 2. Atividade Antioxidante. 3. Concentração Inibitória Mínima. 4. Concentração Bactericida Mínima. 5. Compostos Fenólicos. I. Orsi, Daniela Castilho , orient. II. Barreto, Lívia Cristina Lira de Sá, co-orient. III. Título.

PATRÍCIA DA SILVA MONTES

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (IN VITRO) DE EXTRATOS ALCOÓLICOS DE PRÓPOLIS VERDES COLETADAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

BANCA EXAMINADORA

_____

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

_____

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris
(FCE/ Universidade de Brasília)

_____

Farmacêutica Erika da Silva Monteiro
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF
2020

DEDICATÓRIA

Dedico às pessoas que sempre acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela linda trajetória que pude traçar até hoje. Agradeço pela fé, perseverança e restauração das forças nos momentos de fraqueza.

À minha família, pelo amor incondicional, por todo esforço que fizeram e que fazem para me fornecer o melhor e, principalmente, a minha mãe que nunca deixou que eu desistisse porque sempre confiou mais em mim do que eu mesma. Os seus conselhos e o seu colo sempre foram o aconchego necessário para minha fortificação.

Deixo um agradecimento especial a minha co-orientadora Lívia Barreto pelo incentivo e apoio. E a minha orientadora Dani Orsi pela dedicação do seu tempo ao meu projeto de pesquisa. Seus ensinamentos e conselhos nunca serão esquecidos, e sempre me guiarão nos próximos desafios que enfrentarei.

As minhas mães do coração Ivonete e Maria José, obrigada pelo acolhimento e pelas palavras de conforto.

Aos melhores amigos da vida: Brett, Carla Luana, Carla, Débora, Esther, Gabriela, Harald, Lídia, Luiza, Priscila, Tallyta, Tayanne e Thiago. Obrigada pelos diversos momentos felizes e de diversão, pelas palavras de encorajamento e pelo ombro amigo.

Ao Filip, meu companheiro de todos os dias, obrigada pelo suporte, afeto e por me apoiar sempre.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo dispensado na leitura deste trabalho, contribuindo com melhorias para finalização do mesmo.

Aos funcionários e docentes da Universidade de Brasília, campus Ceilândia, de modo particular as minhas amigas Helena e Vilena.

Aos Apiários M JÁ Mais Mel, Vovô Pedro e empresa Mel do Sol pela doação das amostras de própolis para produção dos extratos.

E a todos que contribuíram com meu trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Introdução: A preocupação com a resistência antimicrobiana tem aumentado devido ao uso intensivo e indiscriminado de antibióticos. Novas alternativas de agentes antimicrobianos naturais possibilitam a substituição, ainda que de forma parcial, dessas drogas sintéticas. A própolis é uma substância complexa natural sintetizada por abelhas por meio de produtos coletados de fontes vegetais. As propriedades biológicas da própolis estão diretamente correlacionadas com sua composição química que varia conforme a região. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e as propriedades físico-químicas de própolis coletadas em três diferentes regiões do Brasil. **Métodos:** Os extratos alcoólicos com 30% (p/v) de própolis *in natura* foram produzidos no laboratório. A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi verificada a partir de três testes: ensaio de difusão em disco, Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os extratos também foram avaliados quanto ao teor de extrato seco, compostos fenólicos (Folin-Denis) e atividade antioxidante (DPPH e ABTS). **Resultados:** Os extratos de própolis estavam de acordo com as especificações exigidas pela legislação brasileira. No que diz respeito a atividade antioxidante, os resultados variaram de 106,03 a 119,96 mM Trolox para o DPPH e de 600,89 a 687,14 mM Trolox para o ABTS. Em relação à atividade antibacteriana, no ensaio de difusão em disco, os extratos de própolis apresentaram atividade frente as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*, com halos de inibição de 24,0-51,5 mm. Na determinação da CBM, os extratos de própolis apresentaram atividade bactericida contra as bactérias Gram-positivas com valores de 10-12 mg/mL e contra as bactérias Gram-negativas com valores de 10-20 mg/mL. Na determinação da CIM, os resultados variaram de 0,075 a 0,25 mg/mL para as bactérias Gram-positivas e 1,20 a >6,85 mg/mL para as bactérias Gram-negativas. **Conclusão:** Todos os extratos de própolis apresentaram maior efeito antibacteriano em espécies Gram-positivas e são menos eficazes em espécies Gram-negativas. A caracterização físico-química dos extratos está em conformidade com os parâmetros exigidos pelo MAPA.

Palavras-chave: Própolis verde; Atividade Antioxidante; Concentração Inibitória Mínima; Concentração Bactericida Mínima; Compostos Fenólicos.

ABSTRACT

Introduction: Concern about the antimicrobial resistance has increased due to the intensive and indiscriminate use of antibiotics. New alternatives of natural antimicrobials allow to replace, even partially, these synthetic drugs. Propolis is a complex natural substance synthesized by bees through products collected from plant sources. The biological properties of propolis are directly related to its chemical composition, which varies by region. It's one of the natural products used for centuries by mankind due to its diverse biological properties, including antimicrobial and antioxidant. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity and the physical and chemical properties of propolis collected in three different regions of Brazil. **Methods:** Alcoholic extracts with 30% (w/v) of fresh propolis were produced in the laboratory. The antimicrobial activity of propolis extracts on Gram-positive and Gram-negative bacteria was verified from three tests: disk diffusion assay, Determination of Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The extracts were also evaluated in terms of dry extract content, phenolic compounds (Folin-Denis) and antioxidant activity (DPPH and ABTS). **Results:** The propolis extracts were in accordance with the specifications required by Brazilian legislation. Regarding the antioxidant activity tests, the results ranged from 106.03 to 119.96 mM Trolox for DPPH and from 600.89 to 687.14 mM Trolox for ABTS. Regarding the antibacterial activity, in the disk diffusion assay, the propolis extracts showed activity against the Gram-positive bacteria *S. aureus, B. cereus* and *S. mutans* with inhibition halos of 24,0-51,5 mm. In determining the MBC, the propolis extracts showed bactericidal activity against Gram-positive bacteria with values of 10-12 mg/mL and against Gram-negative bacteria with values of 10-20 mg/mL. In determining MIC, the results range from 0.075 to 0.25 mg / mL for Gram-positive bacteria and 1.20 to >6.85 mg/mL for Gram-negative bacteria. **Conclusion:** All propolis extracts showed a greater antibacterial effect in Gram-positive species and are less effective in Gram-negative species. The physical-chemical characterization of the extracts is in compliance with the parameters required by the MAPA.

Keywords: Green propolis; Antioxidant activity; Minimum Inhibitory Concentration; Minimum Bactericidal Concentration; Phenolic Compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas típicas de uma célula bacteriana..... 16

Figura 2- Parede celular de bactérias Gram-positivas..... 17

Figura 3- Parede celular de bactérias Gram-negativas..... 18

Figura 4- Estrutura básica dos flavonoides..... 26

Figura 5- Algumas estruturas químicas de flavonoides..... 27

Figura 6 - Obtenção dos extratos de própolis..... 35

Figura 7 – Esquema para determinação da CIM pelo método de microdiluição..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ácidos fenólicos: núcleo básico hidroxifenilpropenóico e seus radicais (R)..... 25

Tabela 2- Requisitos físico-químicos exigidos pelo MAPA necessários à comercialização da própolis..... 33

Tabela 3 - Identificação dos extratos de própolis analisados neste estudo.. 34

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos extratos de própolis..... 39

Tabela 5- Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas testadas..... 41

Tabela 6- Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-negativas testadas..... 41

Tabela 7- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas testadas..... 43

Tabela 8- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-negativas testadas..... 44

Tabela 9- Análises físico-químicas dos extratos de própolis..... 45

Sumário

1 INTRODUÇÃO 12
2.OBJETIVOS 14
2.1 Objetivo geral 14
2.2 Objetivos específicos 14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
3.1 Ecologia bacteriana 15
3.1.1 Morfologia bacteriana 15
3.1.2 Possíveis danos à célula bacteriana por agentes antimicrobianos 18
3.2 Apicultura, própolis e as abelhas *Apis mellifera* 19
3.3 Histórico do uso da própolis na medicina de produtos de origem natural 21
3.4 Publicações e Patentes contendo própolis 21
3.5 Própolis verde e a composição química 22
3.5.1 Compostos fenólicos 24
3.5.2 Ácidos fenólicos e seus ésteres 24
3.5.3 Flavonoides 26
3.6 Solventes utilizados na extração da própolis 28
3.7 Atividades biológicas da própolis 28
3.7.1 Propriedades antimicrobianas da própolis: antibacteriana, antifúngica e antiviral 29
3.7.2 Propriedades biológicas da própolis: anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora 30
3.8 Própolis e legislação brasileira 32
4 JUSTIFICATIVA 33
5 MATERIAIS E MÉTODOS 34
5.1. Obtenção dos extratos de própolis 34
5.2. Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis por ensaio de difusão em disco 35
5.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis pelo método de macrodiluição em caldo 36
5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis pelo método de macrodiluição em caldo 36
5.5. Caracterização físico-química de identidade e qualidade dos extratos de própolis 38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 39
6.1. Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos extratos de própolis 39

6.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas 43
7. CONCLUSÃO 48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 49
ANEXOS.....57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2- azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico

CALDO LB - Caldo Luria Bertani

CBM- Concentração Bactericida Mínima

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute

COX - Cicloxigenase

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EEP- Extrato Etanólico de Própolis

ERO'S - Espécies reativas de oxigênio

IL-1β - Interleucina 1 beta

IL-6- Interleucina 6

LOX - Lipoxigenase

LPS- Lipopolissacarídeos

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NF-κB - Factor nuclear kappa B

nm – Nanômetro

OMS- Organização Mundial da Saúde

PLA2- Fosfolipase A2

TNF-α- Fatores de Necrose Tumoral Alfa

1 INTRODUÇÃO

O exercício das medicinas naturais e a execução de práticas integrativas têm direcionado um interesse cada vez maior para apiterapia: método que utiliza produtos produzidos pelas abelhas como a apitoxina, geleia real, pólen, própolis, mel e outros. A própolis, sob a forma de extratos hidroalcoólicos, vem se destacando devido as suas propriedades terapêuticas tais como: atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica, anticariogênica, cicatrizante e a sua extensa aplicabilidade na indústria farmacêutica e alimentícia (ADELMANN, 2005).

As propriedades da própolis contribuíram para seu uso empírico na medicina popular tradicional. Vários estudos surgiram a fim de verificar e comprovar seus efeitos terapêuticos e farmacológicos. Machado *et al*. (2016) realizaram a caracterização química, capacidade antioxidante, antimicrobiana e antitumoral de vários tipos de própolis brasileiras e Tiveron *et al*. (2011) avaliaram o perfil antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório de diferentes extratos de própolis provenientes da região Sul do Brasil.

A própolis é utilizada na ciência da saúde com base na sua composição química e suas propriedades farmacoterapêuticas. Há uma grande complexidade entre seus componentes químicos e mais do que 300 compostos já foram identificados. Vários estudos apontam que os efeitos farmacológicos observados na própolis são o resultado da ação sinérgica de seus compostos químicos. Vários tipos de própolis foram relatados no mundo, pois há uma variedade de acordo com a flora de determinada região geográfica onde as abelhas fazem a coleta do material vegetal para a sua produção. Por isso a composição da própolis depende das origens das fontes vegetais de diferentes regiões geográficas do mundo (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018; LÓPEZ *et al*., 2014).

No Brasil, o MAPA (BRASIL, 2001) estabelece os limites para fixação de identidade e qualidade de própolis e seus produtos derivados. Algumas dessas especificações vão determinar as características físico-químicas do extrato alcoólico de própolis como: teor mínimo de extrato seco (11% m/v), teor máximo de cera do extrato seco (1% m/m), teor mínimo de compostos fenólicos (0,50% m/m) e as propriedades antioxidantes.

O problema da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas tem se agravado muito nos últimos anos, especialmente nas infecções de origem hospitalar. Drogas que antes se mostravam eficazes na rotina clínica tem perdido sua eficácia contra várias espécies patogênicas. A questão da resistência bacteriana aos antibióticos torna urgente a busca por novos compostos bioativos que representem novas possibilidades de aplicação antimicrobiana (CHUNG *et al*., 2013; FERRONATO *et al*., 2007). Nesse contexto a própolis se destaca como um produto natural com atividade antimicrobiana que pode ser utilizada como agente bactericida e antisséptico em diversas formulações farmacêuticas.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e realizar a caracterização físico-química de extratos alcoólicos de própolis verdes coletadas de diferentes regiões do Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis empregando ensaio de difusão em disco; determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Realizar as análises físico-químicas de determinação de extrato seco, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de própolis.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ecologia bacteriana

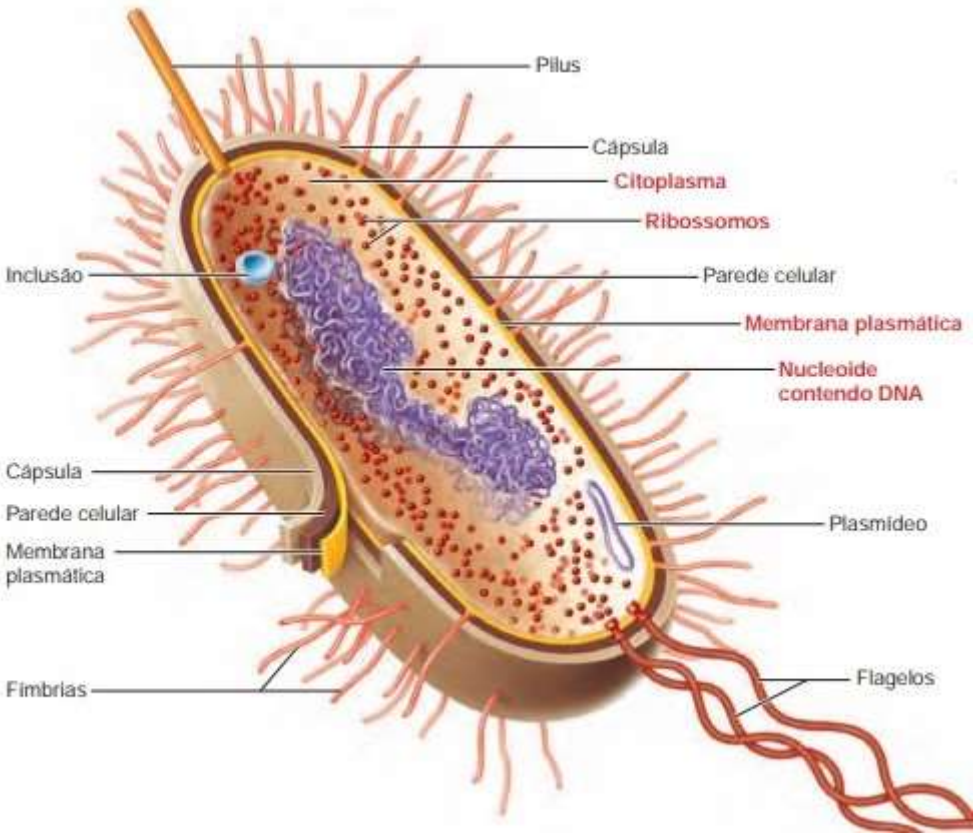
Bactérias são seres unicelulares, ou seja, que são formados por apenas uma célula. Também são seres procarióticos devido à ausência de membrana nuclear. A célula bacteriana pode se apresentar de variadas formas, tais como bacilos (forma de bastão), cilíndricas, cocos (ovoides ou esféricas) e espiral (curvas ou forma de saca-rolhas). Tais formas podem viver isoladas ou reunidas em agrupamentos, com formas típicas que variam entre as espécies (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Muitas bactérias se movimentam devido ao batimento de longos filamentos proteicos ligados à parede e à membrana celular. Esses filamentos são denominados flagelos e são responsáveis pelo movimento de impulsão. Outras não apresentam essas estruturas e por isso precisam deslocar por deslizamento em fluidos. A locomoção bacteriana permite que o microrganismo chegue até o sítio de aderência, ali se reproduza podendo causar uma infecção (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.1.1 Morfologia bacteriana

A célula bacteriana é constituída por uma parede celular e por uma membrana plasmática, conforme esquematizado na Figura 1. A parede celular é um envoltório externo semirrígido e complexo. A principal função da parede celular é proteger a célula contra agressões físicas do ambiente e consequentemente, a morte do organismo. Devido à diferença de composição da parede celular, as bactérias são classificadas em Gram-positivas, por exemplo, *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus mutans*, e Gram-negativas, como *Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas aeruginosas,* entre outras. Sob a parede celular encontra-se a membrana plasmática, que delimita o citoplasma. É constituída por uma dupla camada de fosfolipídios e age como uma barreira seletiva, permitindo e bloqueando a passagem de moléculas e íons para o meio interior e exterior da célula (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 1- Estruturas típicas de uma célula bacteriana



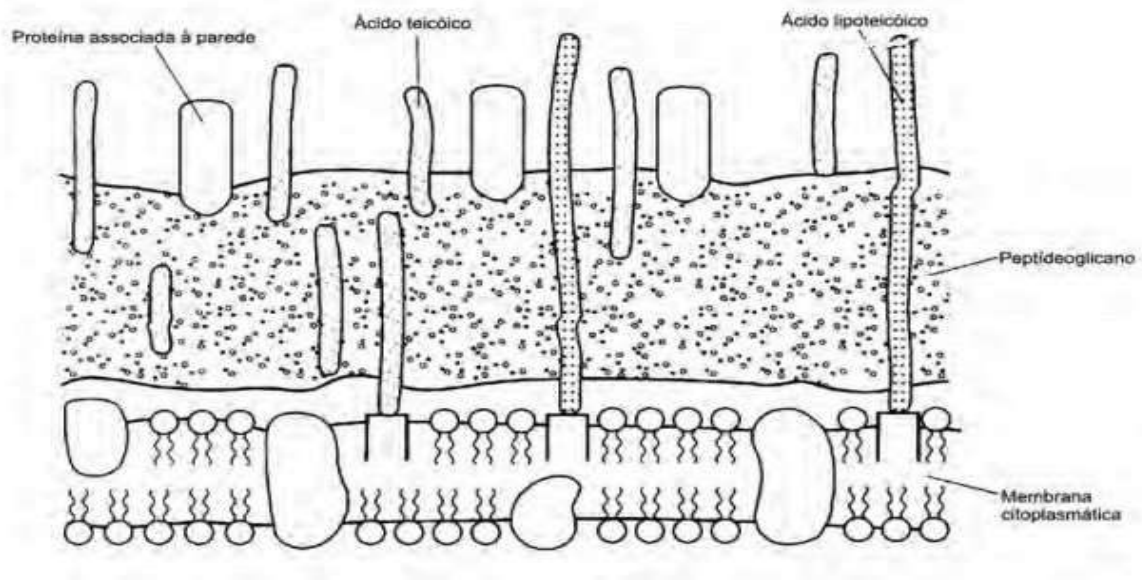
Fonte: TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

As bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentam parede celular composta por uma rede macromolecular denominada peptideoglicano (mureína) que está presente isoladamente ou em combinação com outras substâncias. A camada de peptideoglicano consiste em um dissacarídeo repetitivo ligado por polipeptídios para formar uma rede que envolve e protege toda a célula. A porção dissacarídica é composta de monossacarídeos denominados N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico (de murus, significando parede), que estão relacionados à glicose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012)

Segundo Madigan, Martinko e Parker (2004), as bactérias Gram-positivas, em sua grande maioria, apresentam parede celular com diversas camadas de peptideoglicanos, ou seja, aproximadamente 90% da parede celular é composta por esse polímero conforme ilustrado na Figura 2. Além disso, as paredes celulares das bactérias Gram-positivas contêm ácidos teicóicos, que consistem principalmente de

um álcool (como o glicerol ou ribitol), fosfato e proteínas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 2- Parede celular de bactérias Gram-positivas



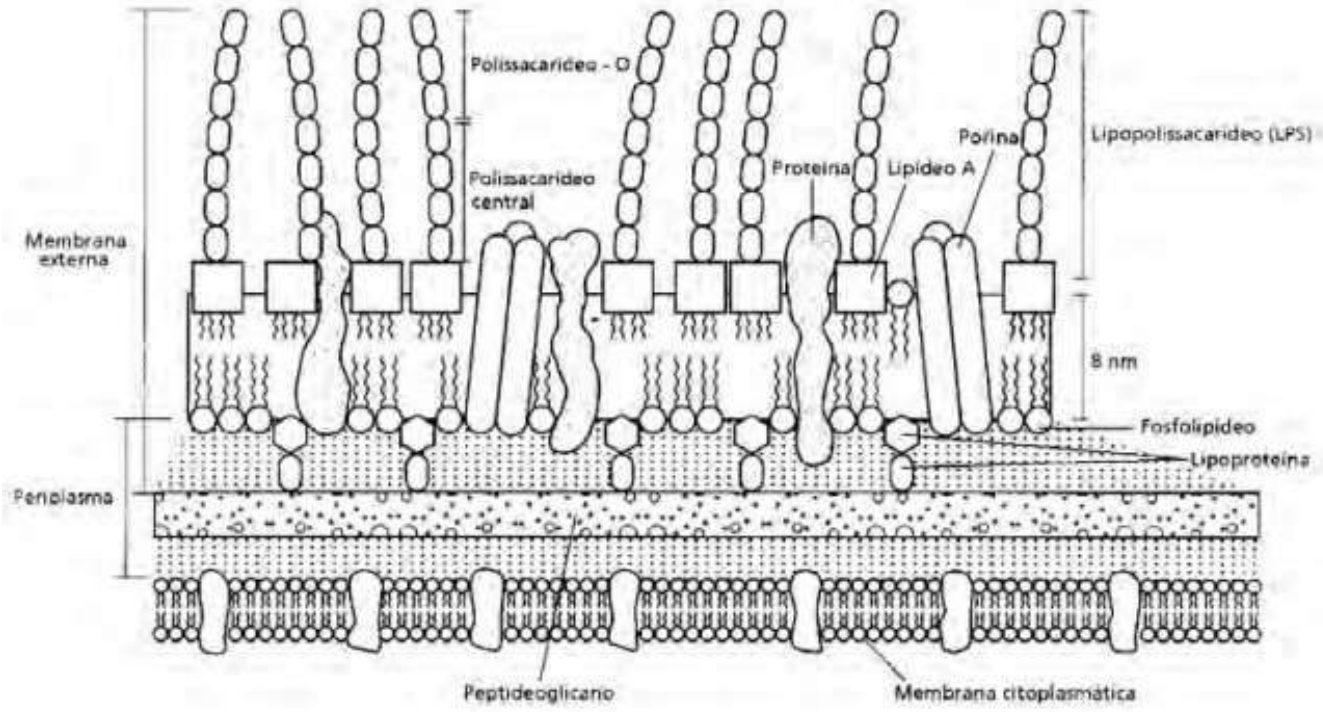
Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006.

As paredes celulares das bactérias Gram-negativas conforme ilustrado na Figura 3 são formadas por poucas camadas de peptideoglicanos e uma membrana localizada externamente à camada de peptideoglicanos. A camada de peptideoglicanos em bactérias Gram-negativas é denominada periplasma (fluido semelhante a um gel, entre a membrana externa e a membrana plasmática). O periplasma contém uma alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. As paredes celulares Gram-negativas não contem ácidos teicóicos. As paredes celulares das bactérias Gram-negativas contêm somente uma pequena quantidade de peptideoglicanos e por isso são mais suscetíveis ao rompimento mecânico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas é formada por uma dupla camada lipídica, possuindo uma camada interna composta basicamente por fosfolipídios e, uma camada externa contendo lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas. Os LPS fornecem duas características importantes às bactérias Gram-negativas: a primeira é que a porção polissacarídica dos LPS, chamada polissacarídeo O, atua como antígeno e é útil para diferenciar as espécies de

bactérias Gram-negativas; a segunda é que esta molécula possui uma porção lipídica chamada lipídio A, que é tóxica e denominada endotoxina, e é um poderoso estimulador das respostas imunes. O resultado desse conjunto é uma membrana extremamente assimétrica, resistente a produtos corrosivos e capaz de repelir compostos hidrofóbicos (MOREIRA; CARVALHO; FROTA, 2015).

Figura 3- Parede celular de bactérias Gram-negativas



Fonte: MOREIRA; SIQUEIRA, 2006.

3.1.2 Possíveis danos à célula bacteriana por agentes antimicrobianos

Algumas drogas antimicrobianas atuam sobre a parede celular de bactérias com o objetivo de causar lise e consequentemente a morte do patógeno. O corpo apresenta mecanismos próprios para evitar o crescimento excessivo dos microrganismos, entre eles: alteração do pH, produção de enzimas líticas (lisozima na lágrima e no muco), acidez estomacal, a pele, os pelos e o jato de urina. No entanto, devido à presença da membrana externa, as bactérias Gram-negativas possuem maior resistência à lisozima, pois diante da degradação da membrana

externa, a membrana interna continua íntegra, detendo a lesão celular por completo. Outro modo de atuação dos agentes antimicrobianos é através da destruição da membrana plasmática. Compostos de amônia quaternária e alguns álcoois agem na degradação da membrana fosfolipídica, levando à bacteriólise, perda de fluidos internos e morte celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.2 Apicultura, própolis e as abelhas *Apis mellifera*

Apicultura é a ciência da arte de criação de abelhas de forma racional com algum intuito, por exemplo, a obtenção de produtos como: mel, própolis, pólen, geleia real, cera e a apitoxina ou veneno. Tais produtos apresentam diversas possibilidades de utilização como: fins cosméticos, alimentares e terapêuticos. Nos últimos anos tem-se visto uma expansão da aplicação de produtos apícolas na medicina tradicional e moderna. Recentemente há muitas pesquisas direcionadas a investigar os benefícios farmacológicos de tais produtos na saúde humana (PASUPULETI *et al*., 2017).

A apicultura é considerada uma atividade econômica da exploração dos produtos apícolas das abelhas *Apis mellifera L*. É uma atividade de baixo impacto ambiental que ajuda na conservação da biodiversidade e com o serviço da polinização das plantas cultivadas e silvestres (BALBINO *et al*., 2015). Para Barros *et al*. (2008): “Apicultura é a técnica de criação de abelhas produtoras de mel em colmeias artificiais, utilizando métodos e equipamentos desenvolvidos para melhor explorar as capacidades naturais destes insetos”.

A própolis, também conhecida por “cola de abelha”, é uma substância complexa natural sintetizada por abelhas por meio de produtos coletados em fontes vegetais. A palavra “própolis” é derivada do grego: ["*pro*” =em favor de] + ["*polis*” =cidade], indicando que este produto natural é usado na defesa da colmeia. Devido à sua natureza cerosa e propriedades mecânicas, a própolis é utilizada pelas abelhas para manter umidade, proteção e temperatura estáveis na colmeia durante todo o ano. Em elevadas temperaturas, a própolis é macia, maleável, e muito pegajosa; em baixas temperaturas ou quase congelada, torna-se rígida e quebradiça (SFORCIN, 2016).

A própolis é produzida por abelhas melíferas (*Apis mellifera*) durante um processo único. As abelhas coletam folhas, brotos de flores, pólen, resinas vegetais

e exsudatos de plantas próximas às colmeias. É durante o processo de volta para casa que começam uma série de reações complexas envolvendo as próprias secreções das abelhas (saliva) e os componentes coletados das plantas, resultando na formação da própolis (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019; ZABAIOU *et al*., 2017). A composição química que varia conforme a origem geográfica e botânica, estação de coleta e condições climáticas (VASILAKI *et al*., 2019).

Segundo Pinto, Prado e Carvalho (2011), as propriedades biológicas da própolis estão diretamente correlacionadas com sua composição química que varia com a flora da região, época da colheita e com a espécie da abelha (no caso brasileiro também o grau de "africanização" da *Apis mellifera* pode influenciar a sua composição). Pegoraro *et al.* (2017) apresentam as subespécies de *Apis mellifera* introduzidas no Brasil: Abelha italiana (*Apis mellifera ligustica*, 1806); Abelha real (*Apis mellifera mellifera*, 1758); Abelha caucasiana (*Apis mellifera caucasica*, 1916); Abelha carnica (*Apis mellifera carnica*, 1979); Abelha *iberiensis* (*Apis mellifera iberiensis*, 1999) e Abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*, 1956).

A apicultura brasileira tomou um novo rumo com a introdução da abelha africana (*Apis mellifera scutellata)* em 1956. Essas abelhas escaparam de um apiário experimental e passaram a se acasalar com as abelhas de raça europeia (*A. m. meliffera, A. m. ligustica, A. m. carnica e A. m. iberiensis*) que chegaram oficialmente em 1839. Os cruzamentos naturais com abelhas de origem europeia e africana formaram um "poli-híbrido" conhecido como abelha africanizada. As características morfológica, ecológica, bioquímica e comportamental predominantes pertencem à *A. m. scutellata* (PEGORARO et al., 2017; SOUZA *et al*., 2016).

No início, a alta defensividade das abelhas africanizadas causou um grande problema na administração dos apiários brasileiros e por isso muitos apicultores abandonaram a atividade. Nos anos 70, a apicultura cresceu e se expandiu para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste devido ao desenvolvimento de técnicas adequadas de manejo das abelhas africanizadas (SOUZA *et al*., 2016).

Dentre a diversidade de própolis existentes, os estudos demonstram que a própolis verde é a mais estudada e exportada no Brasil (SALATINO *et al*., 2011). A origem vegetal predominante da própolis verde brasileira é a *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente por alecrim do campo (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018). A própolis verde é um produto tipicamente brasileiro

e é considerada eficaz no combate a uma série de microrganismos por possuir uma atividade antimicrobiana considerável (VEIGA *et al*., 2017).

3.3 Histórico do uso da própolis na medicina de produtos de origem natural

No decorrer da história, o homem aprendeu a empregar na medicina produtos de origem natural como ervas e extratos. A própolis (administrada em diferentes formas) é um desses produtos naturais utilizados há séculos pela humanidade. Há descrição do seu uso pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito era denominada de “cera negra” e utilizada como um dos materiais no processo de mumificação (PEREIRA *et al*., 2015; PEREIRA *et al*., 2002).

As antigas civilizações aproveitaram as propriedades biológicas da própolis para uso na medicina popular, por exemplo, antipirético, antisséptico e agente cicatrizante. Hipócrates, o pai da medicina, a utilizou como cicatrizante interno e externo. Já Plínio, historiador romano, fez uso para aliviar dores. O termo “Própolis” já era descrito no século XVI na França. Na segunda Guerra Mundial, várias clínicas soviéticas faziam uso dessa substância. A sua utilização passou a abranger tanto a medicina humana como a veterinária e na antiga URSS aplicou-se no tratamento da tuberculose (SFORCIN; BANKOVA, 2011; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Desde então, a própolis tem sido amplamente consumida em alimentos e é utilizada até hoje como remédio popular profilático para prevenir doenças e agir contra vários patógenos, principalmente devido às suas propriedades antimicrobianas estabelecidas (SALATINO *et al*., 2011).

3.4 Publicações e Patentes contendo própolis

No início do século 19 a própolis foi estudada e descrita por Nicolas Louis Vauquelin, um farmacêutico e químico francês. Ássimos (2014) discorreu que o primeiro trabalho indexado no *Chemical Abstract* sobre própolis foi publicado em 1903 e a primeira patente foi escrita em 1904. Segundo Lustosa (2008), somente na década de 80 ocorreu no Brasil o primeiro estudo sobre as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antimicrobiano natural. Foi um estudo comparativo entre o efeito da ação da própolis e antibióticos na inibição de

Staphylococcus aureus, onde a própolis brasileira estudada apresentou mais atividade frente aos antibióticos testados (FERREIRA, 2014; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Em 1980, o Brasil obteve sua primeira patente para o uso da própolis para fins odontológicos (prevenção de cáries e gengivites). Entre os anos de 1995 a 2000 houve apenas duas patentes. Isso indica que o desenvolvimento tecnológico envolvendo a própolis foi baixo nesse período (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Cordeiro *et al*. (2015) relataram que no ano 2000 pesquisadores estudaram amostras de própolis coletadas de todas as regiões do Brasil, objetivando classificá-las a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Esse estudo indicou a existência de uma grande diversidade de própolis dentro do território brasileiro.

Atualmente, no Brasil e no mundo há um crescente interesse pelo consumo da própolis devido aos inúmeros estudos envolvendo suas propriedades terapêuticas. Diversas propriedades biológicas, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, cicatrizante, anestésica e anticarcinogênica têm sido atribuídas à própolis e aos seus constituintes (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

3.5 Própolis verde e a composição química

A própolis é utilizada na ciência da saúde com base na sua composição química e suas propriedades farmacoterapêuticas. Vários estudos apontam que os efeitos farmacológicos observados na própolis são o resultado da ação sinérgica de seus compostos químicos. Vários tipos de própolis foram relatados no mundo, pois há uma variedade de acordo com a flora de determinada região geográfica onde as abelhas fazem a coleta do material vegetal para a sua produção. Por isso a composição da própolis depende das origens das fontes vegetais de diferentes regiões geográficas do mundo (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018; LÓPEZ *et al*., 2014).

Park, Alencar e Aguiar (2002) fizeram uma investigação sobre os perfis químicos das própolis brasileiras. Os pesquisadores coletaram mais de 2 mil amostras brasileiras de própolis de várias regiões e as classificaram em 12 tipos com base em suas características físico-químicas. Realizaram uma comparação

entre o perfil químico das amostras de própolis com as suas possíveis origens botânicas. Assim, os pesquisadores puderam identificar a fonte botânica de três tipos de própolis: tipo 3 (Própolis de álamo), quimicamente semelhante às árvores de álamo (*Populus L*., família *Salicaceae*); tipo 6 (própolis marrom), quimicamente semelhante a *Hyptis*, árvore de divaricate e tipo 12 (própolis verde), quimicamente semelhante a *Baccharis dracunculifolia*. O cerrado brasileiro é uma das áreas mais ricas em espécies de *Baccharis* sp. As plantas de *Baccharis* sp. são um grupo arbustos perenes, lenhosos e dioicos (em que as estruturas reprodutivas masculinas e femininas são formadas em plantas separadas). Das variadas espécies de *Baccharis*, a *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte da própolis verde (PARK *et al*., 2004).

Estudos indicam que há mais de trezentas substâncias químicas em amostras de própolis, das quais se destacam: os flavonoides (galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina), além dos aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido cafeico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzoico), ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, álcoois, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e diidrochalconas, terpenoides, lignanas proteínas, minerais como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e vitaminas B1, B2, B6, C e E (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1983; MARCUCCI, 1996; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; TORETI *et al*., 2013).

Dentre estas classes de substâncias, destacam-se a dos flavonoides e a dos ácidos fenólicos, já que são atribuídas a elas grande parte das atividades biológicas e terapêuticas descritas para a própolis. Os flavonoides e ácidos fenólicos são as principais classes de substâncias fenólicas, cujas relações estrutura-atividade antioxidante em sistemas aquosos ou lipofílicos têm sido extensivamente relatadas (BERRETTA et al., 2017; HUANG et al., 2014; SALATINO et al., 2011).

A própolis verde contém compostos prenilados, não-prenilados e ácido p-cumárico, como por exemplo, o artepilin C que é um importante marcador da própolis verde brasileira. Estes compostos também são encontrados na *Baccharis dracunculifolia*. As diversas propriedades farmacológicas da própolis verde são atribuídas à presença desses compostos em altos níveis (VEIGA et al., 2017; SALATINO et al., 2011). A própolis bruta é constituída de, aproximadamente, 50%

de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de impurezas e artefatos (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018).

Os principais constituintes das própolis de origem chinesa e européia pertencem às classes de ésteres de flavonóides e ácidos fenólicos, enquanto no Brasil, além da presença de flavonóides, a maioria da própolis é constituída principalmente por terpenóides e derivados prenilados do ácido p-cumárico (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; AHN *et al*., 2007).

3.5.1 Compostos fenólicos

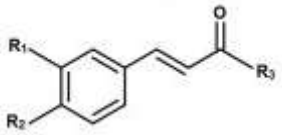
Os compostos fenólicos são definidos como substâncias orgânicas que possuem compostos aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE *et al*., 2005). Nos vegetais, os diversos compostos fenólicos são abundantes e derivam do metabolismo secundário de plantas. São obtidos a partir do metabolismo dos aminoácidos tirosina e fenilalanina. Esse grupo é altamente reativo e antioxidante, além de atuar no sequestro de radicais livres, quelar metais e inibir a enzima lipoxigenase. A atividade biológica da própolis é atribuída em grande parte a presença dos compostos fenólicos (DE CASTRO, 2001).

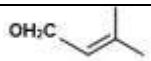
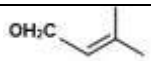
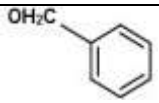
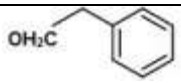
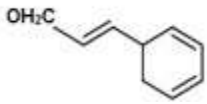
Entre as diversas estruturas fenólicas existentes têm-se os compostos fenólicos, flavonoides e fenóis simples. Essas substâncias são encontradas amplamente no reino vegetal e fazem parte do metabolismo do reino animal. Os animais sintetizam compostos fenólicos em baixas quantidades porque necessitam de fontes externas (dieta) para obter substâncias aromáticas, ou seja, são incapazes de produzir o anel benzênico. No entanto, os vegetais e a maioria dos microrganismos são capazes de sintetizar o anel aromático e através disso produzir compostos fenólicos (OLDONI, 2007).

3.5.2 Ácidos fenólicos e seus ésteres

Os principais ácidos fenólicos são aqueles derivados do ácido benzoico e os derivados do ácido cinâmico. Estes apresentam em sua constituição um núcleo básico hidroxifenilpropenóico, conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1- Ácidos fenólicos: núcleo básico hidroxifenilpropenóico e seus radicais (R)

Núcleo básico hidroxifenilpropenóico 

Ácidos fenólicos	**R1**	**R2**	**R3**
Ácido cafeico	OH	OH	OH
Ácido p-cumárico	H	OH	OH
Ácido ferúlico	OH	OCH_3	OH
Ácido isoferulico	OCH_3	OH	OH
Ácido 3,4- Dimetil-cafeico	OCH_3	OCH_3	OH
Ácido p-cumárico metil éster	H	OH	OCH_3
Ácido p-cumárico isoprenil éster	H	OH	
Ácido cafeico isoprenil éster	OH	OH	
Ácido cafeico benzil éster	OH	OH	
Ácido cafeico feniletill éster	OH	OH	
Ácido cafeico cinamil éster	OH	OH	

Fonte: PEREIRA, 2011.

Adicionalmente, em análises do extrato etanólico de própolis verde por cromatografia líquida de alta eficiência, outros pesquisadores identificaram a presença de outros ácidos, além dos que foram citados na Tabela 1. Tais ácidos identificados são: ácido gálico, Artepilin C, drupanina e bacarina (NASCIMENTO *et al*., 2007; TIVERON *et al*., 2016; YAN *et al*., 2020).

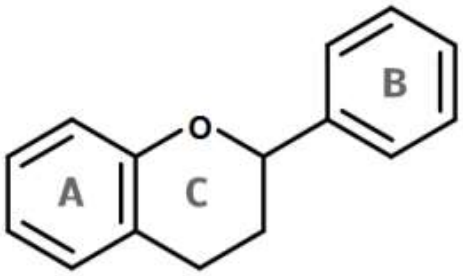
3.5.3 Flavonoides

Segundo Simões *et al*. (2000, apud Machado, 2008) em 1930 um novo composto químico havia sido isolado de laranjas. Acreditou-se naquele momento que se tratava de uma substância do grupo das vitaminas e por isso foi denominado de vitamina “P”. Mais tarde, verificou-se que se tratava do grupo dos flavonoides. Os flavonoides são um dos grupos mais importantes e diversificados que estão amplamente distribuídos no Reino vegetal. Há alguns relatos da presença deles em algas e briófitas; apenas um relato em fungos; em pteridófitas são comumente encontrados, porém, com pequena variedade estrutural; e em angiospermas são abundantemente encontrados com diversificadas variedades estruturais.

Segundo Ássimos (2014) a palavra flavonoide é originária do latim *flavus* que significa amarelo. O termo flavonoide era empregado, inicialmente, para denominar os compostos que apresentavam coloração amarela. Mas, atualmente, este termo passou a ser utilizado para se referir a compostos menos coloridos e incolores, bem como as antocianinas que apresentam coloração vermelha ou azul.

Os flavonoides podem ser encontrados de diversas formas estruturais, porém todas apresentam um núcleo básico em comum composto por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirânico (anel C) conforme a Figura 4 (STALIKAS, 2007).

Figura 4- Estrutura básica dos flavonoides



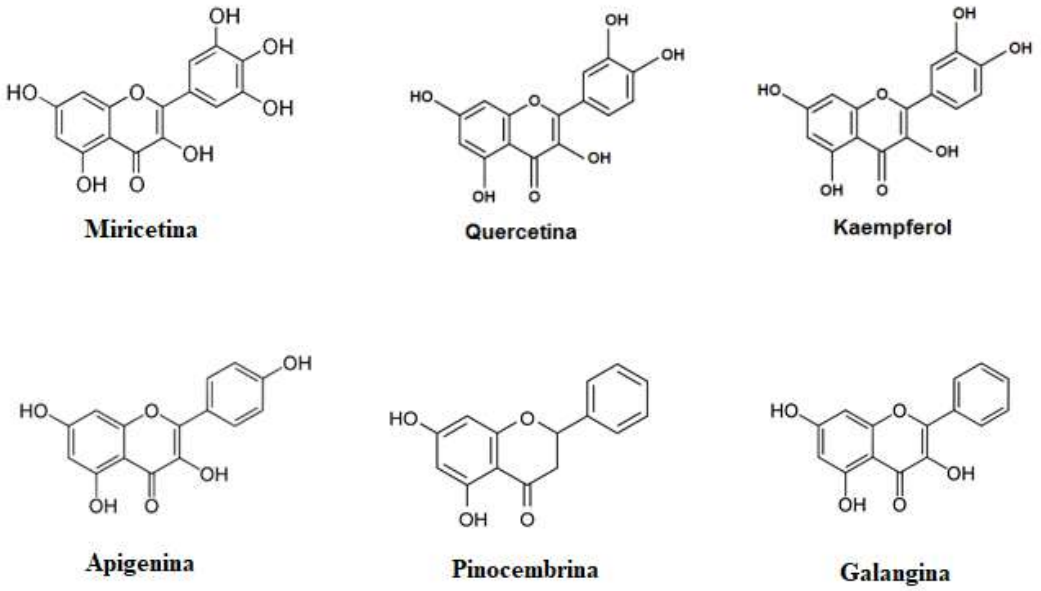
Fonte: STALIKAS, 2007

Os flavonoides estão propensos a sofrer modificações em sua estrutura através dos processos de hidroxilação, acilação, glicosilação, metilação e outros. Tais modificações resultam em uma grande variedade estrutural de flavonoides. O estado de oxidação do anel heterocíclico determina as diversas classes, como

antocianinas, flavanas, flavonas, flavanonas, flavonóis e isoflavonoides (LOPES *et al*., 2000; STALIKAS, 2007).

Apesar da grande complexidade química da própolis, Yuan *et al*. (2020) identificaram e quantificaram a expressão de seis flavonóides descritos como potenciais agentes antioxidantes. Esses seis compostos foram identificados como: miricetina, quercetina, kaempferol, apigenina, pinocembrina e galangina conforme a Figura 5.

Figura 5- Algumas estruturas químicas de flavonoides



Fonte: YUAN *et al*., 2020

Dentre algumas importâncias dos flavonoides nos vegetais, destacam-se as seguintes funções: geração de cores que funcionam para atrair agentes polinizadores ou como uma “barreira” química protetora contra microrganismos, insetos ou animais; redução dos efeitos degradativos da radiação UV da luz solar através da absorção da radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta e do visível (DE CAMPOS, 2017).

3.6 Solventes utilizados na extração da própolis

A própolis bruta, *in natura*, é composta por substâncias hidrofílicas, hidrofóbicas e anfifílicas. No entanto, a maioria dos componentes da própolis é solúvel em óleo e por isso o álcool etílico hidratado é o método de extração mais utilizado. Este solvente é utilizado devido às propriedades apolares da maior parte das substâncias que compõe a própolis (KONISHI *et al.,* 2004).

A própolis tem sido bastante estudada e muitas metodologias já foram utilizadas na extração de seus componentes, podendo-se usar diversos solventes dependendo da finalidade (CORDEIRO *et al*., 2015). Sun *et al*. (2015) analisaram o efeito de diferentes concentrações de solvente etanol em água (25, 50, 75 e 100%) na extração de compostos fenólicos e flavonoides da própolis bruta e observaram que quanto maior a concentração de etanol utilizada, maior a extração desses compostos.

Fontana *et al*. (2004) comprovaram que para o preparo de soluções densas e límpidas o solvente mais adequado a ser utilizado é o etanol 70-80%, sendo que a extração de própolis em meios com maiores concentrações de água tem como resultado uma solução de cor opaca, com turbidez e leitosa. Tal aspecto é devido à porção hidrofóbica que constitui a própolis.

3.7 Atividades biológicas da própolis

Kadosaki *et al*. (2012) reportaram o uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento das doenças infecciosas. Isso favorece o desenvolvimento de resistência bacteriana. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência bacteriana a medicamentos deve ser vista como um problema mundial de saúde pública (OMS, 2010). A resistência antimicrobiana aumenta as chances de não se obter um tratamento eficaz das doenças causadas por esses patógenos multirresistentes (TASHO ; CHO, 2016).

Diante desse cenário, diversas funções da própolis foram amplamente investigadas por ensaio *in vitro* ou *in vivo*. Algumas funções confirmadas apontam o potencial antibacteriano, antiviral, antifúngico, anticancerígeno, imunomodulador, anti-inflamatório e antioxidante (FIKRI *et al*., 2018).

3.7.1 Propriedades antimicrobianas da própolis: antibacteriana, antifúngica e antiviral

Orsi *et al*. (2012) realizaram testes *in vitro* para investigar o sinergismo existente entre própolis e os antimicrobianos que agem ao nível da iniciação da síntese de proteínas, ou seja, tem ação no ribossomo (como cloranfenicol, tetraciclina e neomicina) frente a bactéria Gram-negativa *Salmonella typhi*. Concluíram que a própolis foi capaz de diminuir a resistência bacteriana aos antimicrobianos e atuou de forma sinérgica com os antimicrobianos.

No estudo de Fiordalisi *et al*. (2016) a própolis verde apresentou atividade antibacteriana contra muitas bactérias patogênicas, incluindo bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus pneumoniae*) e bactérias Gram-negativas (*Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella denticola*). E no estudo de Luca *et al*. (2014) a própolis se mostrou ativa contra bactérias cariogênicas, como *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus salivarius*.

Machado *et al.* (2016) realizaram testes com extratos de própolis brasileiras de diferentes origens: verde, marrom e vermelha para verificar a atividade antimicrobiana diante das cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Todos os extratos tiveram resposta antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva). Silva *et al.* (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis brasileiras verde, vermelha e marrom contra cepas ATCC de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp.) e bactérias Gram-negativas (*Klebsiella* spp. e *Escherichia coli*). Observaram que houve atividade antimicrobiana apenas contra as bactérias Gram-positivas, não havendo atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-negativas.

O estudo de Moradkhannejhad *et al.* (2018) evidenciou que a própolis é principalmente ativa contra bactérias Gram-positivas que são mais sensíveis que as bactérias Gram-negativas. A parede celular quimicamente constituída de lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas das bactérias Gram-negativas pode ser a razão da baixa suscetibilidade desse grupo de bactérias a compostos como óleo essencial e extratos de própolis (AZHDARZADEH; HOJJATI, 2016).

Segundo Salazar *et al.* (2018), a própolis contém uma alta concentração de terpenoides que possuem efeitos bacteriostáticos e bactericidas. Eles agem como

um antimicrobiano, sensibilizando a camada fosfolipídica das células, aumentando a permeabilidade e fazendo com que haja perda de componentes intracelulares, levando a morte das células.

O estudo Freires *et al*. (2016) verificou que os extratos de própolis brasileiras apresentaram atividade antifúngica contra leveduras *Candida* spp. (*C. albicans, C. dubliniensis, C. glabrata, C. kruzei, C. tropicalis e C. parapsilosis*). Outros estudos identificaram a atividade da própolis contra fungos *Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton tonsurans* (fungos dermatófitos) e *Candida albicans (*AL-DAAMY; AMEER; ZUHER, 2015). Já Silva *et al.* (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis verde, vermelha e marrom sobre a levedura *Candida albicans* e concluíram que não houve atividade frente a mesma.

Urushisaki *et al*. (2011) verificaram que a própolis verde tem atividade potente antivírus influenza. A causa da atividade antiviral da própolis pode ser atribuída a ácidos cafeoilquínicos. O ácido cafeico teve uma atividade anti-influenza, enquanto o ácido quínico não. O grupo cafeína pode ser um elemento indispensável na estrutura molecular dos ácidos cafeoilquínicos em termos de atividade anti-influenza. Além disso, os outros componentes como: ácido p-cumárico, artepilin C, bacarina, drupanina e kemferida (não possuindo a estrutura de ácido cafeoilquínico) não apresentaram atividade anti-influenza. O ácido cafeoilquínico não apresentou efeito citotóxico na faixa de concentração efetiva para atividade anti-influenza.

Segundo Shimizu *et al.* (2011) três extratos de própolis brasileiras que possuíam composições diferentes foram eficazes contra a infecção cutânea por HSV-1 em camundongos. Assim, a própolis brasileira pode ser caracterizada como tendo efeito anti-herpes *in vivo*.

3.7.2 Propriedades biológicas da própolis: anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora

Dentre os produtos apícolas, a própolis se destaca por possuir o maior potencial antioxidante, sendo essa propriedade atribuída à sua variada composição química. Devido a sua alta atividade antioxidante, supõe-se que a própolis possua efeitos benéficos contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo, reduzindo o efeito tóxico dos radicais livres (NAKAJIMA *et al*., 2009).

A propriedade antioxidante da própolis é uma das atividades biológicas mais estudadas em todo o mundo. Essa propriedade biológica apresenta grande importância nos benefícios gerais que a própolis pode trazer à saúde humana. A capacidade de eliminação de radicais livres dos compostos de própolis pode estar intimamente relacionada às atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticâncer, bem como, prevenção de aterosclerose, danos à pele, envelhecimento e outros (BERRETA *et al*., 2017).

Durante o processo inflamatório há liberação de diversas substâncias mediadoras inflamatórias pelo tecido que foi lesionado. Dentre essas substâncias, estão as espécies reativas de oxigênio (EROS), responsáveis pelos eventos iniciais da inflamação. As enzimas envolvidas no processo inflamatório como a fosfolipase A2 (PLA2) são ativadas e convertem fosfolipídios de membrana em cicloxigenase (COX), ácido araquidônico e lipoxigenase (LOX). O ácido araquidônico formado é convertido em prostaglandina e leucotrieno (principais mediadores inflamatórios) (ARAUJO *et al.,* 2012).

As ERO's conseguem estimular a translocação do fator NK-κB para o núcleo celular para o aumento da expressão das enzimas COX, LOX e PLA2 e mediadores inflamatórios como TNF-α (FAROOQUI ; FAROOQUI, 2010). A inibição do fator NK-κB pode ser a base molecular para a atividade anti-inflamatória da própolis (TIVERON *et al*., 2016). Tiveron *et al.* (2016) testaram a atividade anti-inflamatória da própolis, *in vitro*, e obtiveram alta atividade anti-inflamatória com a redução de ativação do fator NF-κB e da liberação de TNF-α por macrófagos.

O ácido fenil éster cafeico, composto isolado da própolis, é conhecido por sua elevada capacidade antioxidante e propriedade de inibir citocinas mediadoras da inflamação: enzimas LOX, COX e óxido nítrico (FAROOQUI ; FAROOQUI, 2010). Já a crisina, outro composto ativo isolado da própolis, também possui atividade anti-inflamatória. A crisina inibiu o fator NF-κB, a proteína p65, citocinas TNF-α, IL-1β e IL-6 em ratos com lesão medular e reduziu os níveis de oxido nítrico, outro mediador inflamatório (JIANG *et al*., 2014).

A própolis é capaz de acelerar o tempo de cicatrização e aumentar a contração da ferida levando à rápida recuperação do tecido lesionado. Por isso é atribuída a ela a capacidade de regeneração e cicatrização tecidual (ORYAN; ALEMZADEH ; MOSHIRI, 2018).

Vários métodos antioxidantes estão disponíveis para estudar a própolis, entre eles, o ensaio DPPH, o ensaio ABTS, inibição da peroxidação lipídica, inibição de quimioluminescência produzida no sistema H_2O_2/luminol/peróxido de rábano e inibição da quimioluminescência produzida na xantina/luminol/xantina oxidase, entre outros (BERRETA *et al.,* 2017).

Segundo Da Silva *et al*. (2018) a atividade antioxidante da própolis é devido a presença, principalmente, de compostos fenólicos e flavonoides em sua composição. Veiga *et al*. (2017) diante da complexa composição química da própolis, realizaram uma pesquisa para isolar compostos e verificar sua atividade biológica. Compostos isolados como o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, conhecido como Artepilin C são um dos principais componentes com atividade antioxidante, bem como atividade antimicrobiana e imunomoduladora.

Existem demonstrações de que própolis induz efeitos em diferentes células da resposta imune inata através da sua capacidade de modular a síntese de anticorpos. Pode ser usada como uma alternativa para complementar um tratamento quando a resposta imunitária não é o suficiente para controlar uma infecção específica ou um estado patológico (AL-HARIRI, 2019).

3.8 Própolis e legislação brasileira

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu através da Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 o regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos apícolas. O regulamento abrange a própolis *in natura* e o extrato alcoólico com os seguintes requisitos físico-químicos e provas qualitativas: propriedades físico-químicas (atividade de oxidação, cera, cinzas, compostos fenólicos, extrato seco, flavonoides, metanol, solúveis em etanol, teor alcoólico), características organolépticas (aroma, cor, sabor e aspecto) e demais condições necessárias para considerar o produto apto e seguro para consumo e comercialização (ausência de poluentes, aditivos e critérios higiênico-sanitário) (BRASIL, 2001). Constam na Tabela 2 os requisitos físico-químicos exigidos pela norma.

Tabela 2- Requisitos físico-químicos exigidos pelo MAPA necessários à comercialização da própolis

Parâmetros	Própolis Bruta	Extrato hidroalcoólico
Atividade de oxidação	Máximo de 22 segundos	Máximo de 22 segundos
Cera	-	1% do extrato seco
Cinzas	Máximo de 5% (m/m)	-
Compostos fenólicos	Mínimo de 5% (m/m)	Mínimo de 0,5% (m/m)
Extrato seco	-	11% (m/v)
Flavonoides	Mínimo de 0,5% (m/m)	Mínimo de 0,25% (m/m)
Metanol	-	Máximo 0,40 mg/L
Solúveis em Etanol	Mínimo de 35% (m/m)	-
Teor alcoólico	-	Máximo de 70° GL (v/v)

Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001

Conforme determinação da RDC n° 24 de 14 de junho de 2011, os produtos elaborados a base própolis com finalidade terapêutica podem ser registrados como medicamento específico. Estes produtos são classificados como opoterápicos, ou seja, preparações obtidas a partir de glândulas, tecidos, outros órgãos e secreções animais, destinada a fim terapêutico ou medicinal (BRASIL, 2011).

4 JUSTIFICATIVA

Recentemente, há um interesse crescente no potencial farmacoterapêutico de produtos naturais. Na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares inclui-se a apiterapia. Os produtos naturais são uma fonte interessante de novas terapias, diante do cenário em que há o uso indiscriminado de antimicrobianos (principal força motora para o desenvolvimento da resistência de microrganismos). A própolis brasileira apresenta uma variada composição química de acordo com a sua origem em diferentes regiões do país. Vários estudos comprovam o potencial da própolis para diversas aplicações farmacológicas e confirmam a sua eficácia como antioxidante, antiinflamatório e antimicrobiano. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e realizar a caracterização físico-química de extratos alcoólicos de própolis verdes coletadas de diferentes regiões do Brasil.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção dos extratos de própolis

As amostras de própolis foram doadas por apiários e empresas produtoras de mel localizadas no Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso. As amostras foram trituradas em cadinho de porcelana com adição de etanol 96°GL. Foram preparados extratos com 30% (p/v) de própolis *in natura*, ou seja, pesou-se 30 g de própolis *in natura* para cada 100 mL de etanol (Figura 6). Após a maceração, para obtenção dos extratos de própolis, o material foi mantido sob agitação mecânica a temperatura ambiente por 18 horas e depois a solução foi filtrada. A Tabela 3 apresenta a identificação dos extratos de própolis analisados neste estudo.

Tabela 3 - Identificação dos extratos de própolis analisados neste estudo

Amostra	Doador da própolis	Região do Brasil	Tipo	Elaboração do extrato
1	Empresa Mel do Sol (Águas Lindas, Goiás)	Minas Gerais, Sudeste	Verde	Extrato alcoólico, com 30% de própolis in natura
2	Apiário do Vovô Pedro (Campo Grande, Mato Grosso)	Minas Gerais, Sudeste	Verde	Extrato alcoólico, com 30% de própolis in natura
3		Paraná, Sul	Verde	Extrato alcoólico, com 30% de própolis in natura
4	Apiário M JÁ Mais Mel (Brasília, Distrito Federal)	Distrito Federal, Centro oeste	Verde	Extrato alcoólico, com 30% de própolis in natura

Figura 6 - Obtenção dos extratos de própolis

Fonte: AUTORIA PRÓRIA

5.2. Estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis por ensaio de difusão em disco

O método de ensaio de difusão em disco foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1{,}0 \times 10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro.

Para realizar o ensaio de difusão em disco, com o auxílio de *swab* estéril, o inóculo microbiano foi semeado na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton, até a obtenção de um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram aplicados discos de papel de filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 20 µL dos extratos de própolis. Os testes foram realizados em triplicata e as leituras foram realizadas após 24 horas de incubação a 37ºC, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro.

5.3. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis pelo método de macrodiluição em caldo

Os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0x10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições em caldo LB das culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL.

Os extratos de própolis foram diluídos em caldo LB em diferentes concentrações. Então, adicionou-se em tubos estéreis 1,0 mL do inóculo na concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL e 1,0 mL das diferentes concentrações de extratos de própolis, resultando em uma concentração final de bactérias de $5,0 x10^5$ UFC/mL. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL e 1,0 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL e 1,0 mL de extrato de própolis. Os testes foram realizados em duplicata.

Os tubos foram incubados a 37ºC por 18 horas e então as diluições foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton e incubadas a 37ºC por 18-24 horas e a CBM foi determinada na menor concentração dos extratos de própolis onde não foram observadas colônias nas placas.

5.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis pelo método de macrodiluição em caldo

Para a determinação da CIM, os inóculos utilizados foram cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella*

pneumoniae ATCC BAA-1706, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0x10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro. Foram realizadas diluições em caldo LB das culturas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150, resultando em uma concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL.

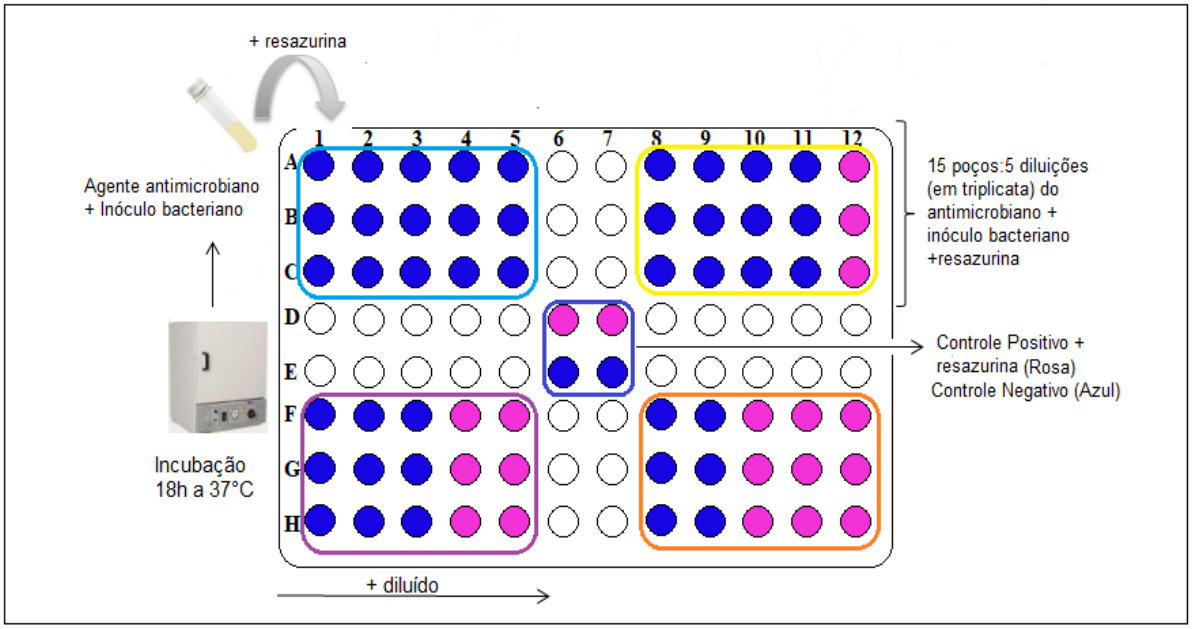
Os extratos de própolis foram diluídos em caldo LB em diferentes concentrações. Então, adicionou-se em tubos estéreis 1,0 mL do inóculo na concentração $1,0x10^6$ UFC/mL e 1,0 mL das diferentes concentrações de extratos de própolis, resultando em uma concentração final de bactérias de $5,0x10^5$ UFC/mL. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL e 1,0 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 1,0 mL do inóculo na concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL e 1,0 mL de extrato de própolis. Os tubos foram incubados a 37ºC por 18 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

De acordo com a CLSI (2015), a Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento de um microrganismo determinado por turbidez em testes de sensibilidade por diluição em caldo. Como os extratos de própolis são pouco solúveis em meio aquoso, o contato destes com o caldo LB deixou a solução diluída com aspecto leitoso e, portanto, com elevada turbidez. Assim o método convencional de leitura da turbidez a 625 nm, após incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano foi inviabilizada nos testes com os extratos de própolis.

Então, a metodologia para a determinação da CIM foi modificada de acordo com Ristivojević *et al*. (2016). Após o período de incubação das diferentes diluições do agente antimicrobiano com o inóculo bacteriano, o método colorimétrico da resazurina sódica 0,01% foi utilizado, aplicando-se 20 µL da solução de resazurina em 100 µL de cada teste conforme a Figura 7, para realizar a leitura visual dos resultados, em que a cor azul caracterizou a inatividade bacteriana e a cor rosa o crescimento das bactérias. Portanto a CIM foi definida como a menor concentração dos extratos de própolis que inibiram o crescimento microbiano e apresentaram cor azul na presença da resazurina. A resazurina é um indicador de óxido-redução

usado na avaliação da viabilidade celular. Esse reagente apresenta cor azul e se torna rosa e fluorescente quando reduzido a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas (SARKER *et al*., 2007).

Figura 7 – Esquema para determinação da CIM pelo método de macrodiluição



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA

5.5. Caracterização físico-química de identidade e qualidade dos extratos de própolis

As amostras foram colocadas em cadinhos (previamente secos e pesados) e mantidas em estufa a 105°C até se obter peso constante, sendo determinado o teor de extrato seco (IAL, 2008). Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de resíduo seco (sólidos solúveis em etanol) foi calculado pela razão entre a massa de resíduo depositada no cadinho e a massa inicial de própolis bruta extraída, em porcentagem. Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912). A atividade antioxidante *in vitro* foi determinada pelos métodos de DPPH (KIM *et al*., 2002) e ABTS (RE *et al*., 1999).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma vez que o aumento da resistência aos antibióticos pode levar ao fracasso terapêutico de doenças de etiologia conhecida, investigamos nesse estudo a atividade antibacteriana da própolis verde, um produto natural e suas características físico-químicas. Diferenças obtidas nas análises de cada um dos extratos etanólicos de própolis verde podem ser explicados pela diversidade na composição das amostras de própolis bruta coletadas nas regiões Sudeste, Sul e Centro-oeste do Brasil.

6.1. Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos extratos de própolis

A Tabela 4 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana (ensaio de difusão em disco) dos extratos das própolis deste estudo, onde foram aplicados 20 µL de cada extrato de própolis nos discos de papel previamente esterilizados.

Tabela 4 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco dos extratos de própolis

Extratos de própolis	Microrganismos testados (diâmetro dos halos em milímetros)						
	S. aureus	***B. cereus***	***S. mutans***	***P. aeruginosa***	***K. pneumoniae***	***S. enterica***	***E. coli***
1 (Mel do Sol)	27,5±0,70	37,0±2,82	26,3±2,30	NI	NI	NI	NI
2 (Minas)	28,5±0,70	28,5±0,70	31,5±2,12	NI	NI	NI	NI
3 (Paraná)	26,0±1,41	27,5±0,70	24,0±0,01	NI	NI	NI	NI
4 (DF)	24,3±0,57	51,5±2,80	45,0±0,00	NI	NI	NI	NI

Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições; NI = não houve inibição do crescimento microbiano; 1- extrato alcoólico de própolis verde Mel do Sol; 2- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô MG; 3- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô PR; 4- extrato alcoólico de própolis verde Apiário DF

O método de ensaio de difusão em disco é frequentemente usado para testar a susceptibilidade de antimicrobianos contra uma variedade de microrganismos. A

atividade antimicrobiana é determinada medindo o diâmetro da zona de inibição, ou seja, quanto maior for o diâmetro do halo formado, maior a atividade antibacteriana. Neste estudo, os halos de inibição medidos para os diferentes extratos de própolis testados variaram de 24,3 a 28,5 mm para a bactéria *S. aureus*; de 27,5 a 51,5 mm para a bactéria *B. cereus* e de 24,0 a 31,5 mm para a bactéria *S. mutans*. Nessa técnica utilizada, a bactéria *B. cereus* apresentou maior sensibilidade aos extratos de própolis, principalmente ao extrato do Distrito Federal. Não houve a formação do halo de inibição para as bactérias Gram-negativas: *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* e *E. coli*.

As análises permitem afirmar que os extratos de própolis verde foram eficazes somente contra as bactérias Gram-positivas. Tal atividade pode ser entendida com base na diferença da composição da parede celular entre essas bactérias. Esses resultados estão de acordo com a literatura, em que Machado *et al*. (2016) afirmam que o extrato de própolis possui maior efeito em espécies Gram-positivas e é menos eficaz em espécies Gram-negativas.

Resultados semelhantes foram relatados por MORADKHANNEJHAD *et al.* (2018) empregando a técnica de difusão em disco. Os autores identificaram a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, porém não observaram halos de inibição contra as bactérias Gram-negativas *S. enterica*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

6.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas

As Tabelas 5 e 6 apresentam a CBM dos extratos de própolis considerando o peso seco de cada extrato (em mg) e o volume de extrato (em mL) para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas.

Tabela 5- Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas

Extratos de própolis	*S. aureus* ATCC 25923		*B. cereus* ATCC 14579		*S. mutans* ATCC 25175	
	CBM		CBM		CBM	
	(mg/mL)	(mL/mL)	(mg/mL)	(mL/mL)	(mg/mL)	(mL/mL)
1 (Mel do Sol)	10	0,17	2,5	0,04	12	0,20
2 (Minas)	6	0,10	1,0	0,02	6	0,10
3 (Paraná)	10	0,17	2,5	0,04	9	0,15
4 (DF)	9	0,15	2,0	0,03	9	0,15

1- extrato alcoólico de própolis verde Mel do Sol; 2- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô MG; 3- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô PR; 4- extrato alcoólico de própolis verde Apiário DF.

Tabela 6- Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-negativas

Extratos de própolis	*P. aeruginosa* ATCC 27853		*K. pneumoniae* ATCC BAA-1706		*S. enterica* ATCC 14028		*E. coli* ATCC 25922	
	CBM		CBM		CBM		CBM	
	(mg/mL)	(mL/mL)	(mg/mL)	(mL/mL)	(mg/mL)	(mL/mL)	(mg/mL)	(mL/mL)
1 (Mel do Sol)	15	0,25	20	0,33	20	0,33	20	0,33
2 (Minas)	20	0,33	15	0,25	15	0,25	15	0,25
3 (Paraná)	15	0,25	20	0,33	20	0,33	12	0,20
4 (DF)	20	0,33	15	0,25	15	0,25	10	0,17

1- extrato alcoólico de própolis verde Mel do Sol; 2- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô MG; 3- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô PR; 4- extrato alcoólico de própolis verde Apiário DF.

Dentre os quatro tipos de extratos alcoólicos de própolis testados, o extrato 2 (1 mg/mL) de Minas Gerais obteve maior atividade bactericida frente a bactéria *B. cereus* (Gram-positiva), seguido pelo extrato 4 do Distrito Federal (2 mg/mL). Os extratos 2 de Minas Gerais (6 mg/mL) e o extrato 4 do Distrito Federal (9 mg/mL) obtiveram os melhores resultados de CBM contra a bactéria *S. aureus*. Os resultados de CBM contra a bactéria *S. mutans* foram próximos aos resultados de *S. aureus,* apresentando menor CBM para o extrato 2 de Minas Gerais (6 mg/mL), seguido pelos extratos 3 do Paraná e 4 do Distrito Federal (ambos com CBM de 9 mg/mL). O extrato de própolis 2 de Minas Gerais apresentou a menor Concentração Bactericida Mínima para todas as cepas Gram-positivas testadas.

Vários autores mostraram os efeitos de diferentes extratos de própolis coletados de várias regiões geográficas no mundo para *S. aureus*. No estudo de Ristivojević et al. (2018) foram elaborados 53 extratos de própolis coletados na Sérvia. A CBM para *S. aureus* ATCC 25923 de alguns dos extratos de própolis laranja variou de 12 a 14 mg/mL. No estudo de Gomes et al. (2016), o extrato de própolis marrom coletado no Mato Grosso do Sul apresentou CBM de 4,5 a 18,9 mg/mL para as diferentes cepas de bactérias *S. aureus* testadas. No estudo de Tiveron et al. (2016) foram coletadas 78 amostras de própolis brasileiras nos estados de Paraná e Santa Catarina. A CBM para *S. aureus* ATCC 25923 não foi atingida nas diluições testadas para a maioria dos extratos testados e os autores reportaram que a CBM teve valor maior que 1,6 mg/mL.

Os valores de CBM das bactérias Gram-negativas foram maiores quando comparados com os valores das bactérias Gram-positivas. Para as bactérias *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *S. enterica* os resultados de CBM variaram de 15 a 20 mg/mL. A bactéria *P. aeruginosa* obteve o menor valor de CBM para os extratos 1 da Mel do Sol e 3 do Paraná (ambos com CBM de 15 mg/mL). Já para as bactérias *K. pneumoniae* e *S. enterica*, o menor valor de CBM de 15 mg/mL foi obtido com os extratos 2 de Minas Gerais e 4 do Distrito Federal. Neste estudo, a bactéria *E. coli* mostrou-se mais sensível aos efeitos antimicrobianos dos extratos de própolis e o menor valor de CBM foi obtido para o extrato de própolis 4 do Distrito Federal (10 mg/mL), seguido pelo extrato de própolis 3 do Paraná (12 mg/mL).

6.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas

Os valores obtidos no teste de CIM para as bactérias Gram positivas e Gram-negativas estão apresentados nas Tabelas 7 e 8, considerando o peso seco de cada extrato (em mg) e o volume de extrato de própolis (em µL).

Tabela 7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-positivas testadas

Extratos de própolis	*S. aureus* ATCC 25923		*B. cereus* ATCC 14579		*S. mutans* ATCC 25175	
	CIM		CIM		CIM	
	(mg/mL)	(µL/mL)	(mg/mL)	(µL/mL)	(mg/mL)	(µL/mL)
1 (Mel do Sol)	0,075	1,25	0,10	1,67	0,10	1,67
2 (Minas)	0,20	3,57	0,10	1,67	0,15	2,50
3 (Paraná)	0,15	2,50	0,075	1,25	0,25	4,20
4 (DF)	0,15	2,50	0,20	3,57	0,25	4,20

1- Extrato alcoólico de própolis verde Mel do Sol; 2- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô MG; 3- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô PR; 4- extrato alcoólico de própolis verde Apiário DF

Dentre o grupo das bactérias Gram-positivas, as bactérias *S. aureus* e *B. cereus* foram as mais sensíveis frente ao efeito bacteriostático dos extratos de própolis verde, apresentando valores de CIM de 0,075 a 0,20 mg/mL. Para bactéria *S. mutans* os valores de CIM variaram de 0,10 a 0,25 mg/mL. Para as bactérias *S. aureus* e *S. mutans* o melhor resultado de CIM foi obtido para o extrato de própolis verde 1 da Mel do Sol. Já para a bactéria *B. cereus* o melhor resultado de CIM foi obtido para o extrato 3 do Paraná.

No estudo de Ristivojević *et al.* (2016), a atividade antibacteriana de amostras de própolis do Álamo europeu contra várias espécies bacterianas foi determinada por ensaio de concentração inibitória mínima. A atividade antibacteriana mais forte foi exibida contra *S. aureus*, com um valor de CIM de 0,5 mg/mL e esse valor foi

mais elevado que os valores de CIM encontrados para as bactérias Gram-positivas do nosso estudo (0,075 a 0,25 mg/mL).

Tabela 8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos de própolis para as bactérias Gram-negativas testadas

Extratos de própolis	*P. aeruginosa* ATCC 27853		*K. pneumoniae* ATCC BAA-1706		*S. enterica* ATCC 14028		*E. coli* ATCC 25922	
	CIM		CIM		CIM		CIM	
	(mg/mL)	(µL/mL)	(mg/mL)	(µL/mL)	(mg/mL)	(µL/mL)	(mg/mL)	(µL/mL)
1 (Mel do Sol)	4,80	80,0	> 6,85	> 114,3	2,57	42,86	6,85	114,3
2 (Minas)	6,85	114,3	6,85	114,3	0,80	13,34	6,85	114,3
3 (Paraná)	6,85	114,3	> 6,85	> 114,3	3,43	57,15	6,85	114,3
4 (DF)	6,85	114,3	6,85	114,3	1,20	20,00	6,85	114,3

1- extrato alcoólico de própolis verde Mel do Sol; 2- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô MG; 3- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô PR; 4- extrato alcoólico de própolis verde Apiário DF.

Em relação as bactérias Gram-negativas, a bactéria *S. enterica* foi a mais sensível frente ao efeito bacteriostático dos extratos de própolis verde, apresentando valores de CIM de 0,80 a 3,43 mg/mL. Para bactéria *P. aeruginosa*, o resultado variou de 4,80 a 6,85 mg/mL. Já para a bactéria *K. pneumoniae* os valores de CIM foram de 6,85 mg/mL a concentrações superiores a 6,85 mg/mL. A CIM da bactéria *E. coli* foi de 6,85 para todos os extratos testados. O menor valor de CIM encontrado para a bactéria Gram-negativa *S. enterica* (0,80 mg/mL) foi 3 vezes maior que o maior valor de CIM da bactéria Gram-positiva *S. mutans* (0,25 mg/mL). Os resultados do nosso estudo estão de acordo com os dados publicados na literatura que indicam maior atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias Gram-positivas e menor atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias Gram-negativas.

No estudo de Silva *et al.* (2017) os extratos de própolis verde exibiram valores de CIM variando de 0,25 a 0,5 mg/mL para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 25923 e as bactérias Gram-negativas *Klebsiella* spp. e *E. coli* ATCC 25922. Tiveron

et al. (2016) relataram valores de CIM de 0,012 a 0,1 mg/mL para as bactérias Gram-positivas *S. mutans* e *S. aureus* e valores de CIM de 0,1 a 0,2 mg/mL para a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*.

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis *et al.* (2001) propuseram uma classificação sobre o potencial antimicrobiano de produtos naturais, com base nos resultados de CIM: inibidores fortes - CIM de até 0,5 mg / mL; inibidores moderados - CIM entre 0,6 e 1,5 mg/ mL e inibidores fracos - CIM acima de 1,6 mg/ mL. Já Webster *et al.* (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1,0 mg/mL ou menos. Seguindo a primeira classificação, todos os extratos de própolis são inibidores fortes contra as bactérias Gram-positivas testadas e são considerados inibidores fracos contra as bactérias Gram-negativas, com exceção do extrato de própolis 2 de Minas Gerais contra a cepa *S. enterica* que obteve inibição moderada. Adicionalmente, todos estes resultados são satisfatórios (com CIM ≤ 1,0 mg/mL) segundo Webster *et al.* (2008) para os extratos de própolis contra bactérias Gram-positivas.

6.4 Análises físico-químicas dos extratos de própolis

A Tabela 9 mostra os percentuais de extrato seco, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante presentes nos extratos de própolis verde coletadas das regiões Sudeste, Sul e Centro-oeste do Brasil.

Tabela 9- Análises físico-químicas dos extratos de própolis

Extratos de própolis	Extrato Seco (%)	Compostos Fenólicos (%)	DPPH TEAC (mM Trolox)	ABTS TEAC (mM Trolox)
1 Mel do Sol	13,60±0,35[a]	3,17±0,14[a]	119,96±2,33[a]	643,42±13,95[a,b]
2 Minas	12,45±0,07[b]	2,86±0,01[a]	115,07±6,19[a,b]	687,14±26,66[b]
3 Paraná	13,69±0,01[a]	2,42±0,08[b]	106,03±4,30[b]	639,04±30,37[a,b]
4 DF	11,70±0,53[c]	1,79±0,28[c]	108,70±4,09[a,b]	600,89±24,03[a]

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata ± desvio padrão. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a $p<0,05$ de acordo com o teste de Tukey. 1- extrato alcoólico de própolis verde Mel do Sol; 2- extrato alcoólico de própolis

verde Apiário do Vovô MG; 3- extrato alcoólico de própolis verde Apiário do Vovô PR; 4- extrato alcoólico de própolis verde Apiário DF

A quantificação do extrato seco consiste na porcentagem seca de sólidos dissolvidos nos extratos de própolis, sendo um dos parâmetros de qualidade estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis, com um valor mínimo de 11% (m/v) (BRASIL, 2001). A concentração de extrato seco de 11% indica que o extrato foi elaborado com no mínimo 30% (p/v) de própolis *in natura*. A porcentagem de extrato seco das amostras deste estudo variou de 11,70 a 13,69% e se enquadraram nos parâmetros da legislação.

Nos extratos de própolis o mínimo exigido pela legislação brasileira, em relação ao teor de compostos fenólicos, é de 0,50% (m/m) e todos os extratos analisados neste estudo ficaram com valores de compostos fenólicos dentro dos limites exigidos pela legislação (1,79-3,17%). Resultados semelhantes foram encontrados por Soares *et al*. (2017), que avaliaram a qualidade de oito amostras de extratos de própolis comerciais e os teores de compostos fenólicos totais variaram de 0,52-3,57%. Sun *et al*. (2015) reportaram resultados similares, onde o extrato de própolis proveniente de Pequim, China, elaborado com 25% de própolis *in natura* apresentou 1,58% de compostos fenólicos.

No que diz respeito aos testes de atividade antioxidante, os resultados deste estudo para as amostras variaram de 106,03 a 119,96 mM Trolox para DPPH e de 600,89 a 643,42 mM Trolox para ABTS. Muitos estudos apresentaram uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos de própolis (ANDRADE *et al*., 2017; BITTENCOURT *et al*., 2015). Nota-se que para quantificação de atividade antioxidante pelo método DPPH, não houve diferença estatística entre as amostras 1, 2 e 4. Barbosa *et al*. (2016), estudando o potencial antioxidante de própolis coletadas em Roraima, obtiveram 0,085 mM Trolox no ensaio do DPPH. Os resultados exibidos pelas amostras de própolis do nosso estudo são bastante superiores quando comparados aos resultados encontrados por Barbosa *et al*. (2016). Essa diferença pode estar relacionada as regiões geográficas e a composição química das plantas de onde as abelhas coletaram as resinas para produzir a própolis, considerando que a vegetação dos locais de coleta apresenta plantas que produzem compostos secundários com relevante atividade antioxidante.

O sinergismo de componentes fenólicos com outros compostos químicos são os responsáveis pela ação antimicrobiana da própolis (BANKOVA, 2005). Sendo assim, ao correlacionarmos a ação antimicrobiana destes extratos de própolis com o teor de substâncias fenólicas e elevada atividade antioxidante, associa-se a uma boa ação antimicrobiana dos extratos de própolis verdes deste estudo frente às bactérias Gram-positivas.

7. CONCLUSÃO

As amostras de extratos etanólicos de própolis verde provenientes de três diferentes regiões do Brasil (Sudeste, Sul e Centro-oeste) apresentaram atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas neste estudo, porém a maior atividade antibacteriana ocorreu para as bactérias Gram-positivas. Os valores de CIM e CBM variaram entre os extratos de própolis obtidos das diferentes regiões brasileiras, comprovando assim que estudos de sazonalidade quando se referem a produtos naturais, são de extrema relevância para futuras pesquisas. Verificou-se também que os extratos própolis verde apresentaram alta atividade antioxidante, o que pode estar relacionado com a sua atividade antimicrobiana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELMANN, J. **Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde. Paraná: Universidade Federal do Paraná. 2005.

AHANGARI, Z.; NASERI, M.; VATANDOOST, F. Própolis: composição química e suas aplicações. **Iranian Endodontic Journal**, v.13, n.3, p. 285-292, 2018.

AHN, M. et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 235-243, 2007.

AL-DAAMY, A. A-H.; AMEER, H. A-A, ZUHER, H. Antifungal activity of propolis against dermatophytes and *Candida albicans* isolated from human mouth. **Journal of Contemporary Medical Sciences** v. 1, n. 3, p.4-8, 2015.

AL-HARIRI, M. Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis. **Journal of Family and Community Medicine**.v.26, p. 57-60, 2019.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.

ARAUJO, M. A. R. et al. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 208-219, 2012.

ÁSSIMOS, A. A. **Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração**. 2014. 88 p. Dissertação [Mestrado em Química Analítica] – Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Belo Horizonte, 2014.

AZHDARZADEH, F.; HOJJATI, M. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. **Nutrition and Food Sciences Research**, v. 3, n. 1, p.43-50, 2016.

BALBINO, V. A.; BINOTTO, E.; SIQUEIRA, E. S. Apicultura e responsabilidade social: desafios da produção e dificuldades em adotar práticas social e ambientalmente responsáveis. **Revista Eletrônica de Administração**, v. 21, n. 2, p. 348-377, 2015.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Product,** v. 46, n.4, p.471-474, 1983.

BANKOVA, V.; DE CASTRO, S.; MARCUCCI, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie,** v. 31, p.3-15, 2000.

BARBOSA, S. R. M. et al.Teor de fenólicos e atividade antioxidante de própolis em áreas de floresta e savana de Roraima. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v.2 n.3, 2016.

BARROS, D S. et al. Mapeamento e caracterização ambiental das áreas apícolas dos municípios de Mucajaí e Cantá do Estado de Roraima. **Agro@mbiente On-line**, v.2, n. 1, p. 76 - 87, 2008.

BERRETTA, A. A. et al. Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. **Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization**, p.55-98, 2017.

BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, n. 76, p.449-457, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Brasília, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 24/2011 de 14 de junho de 2011. Aprova o regulamento técnico que estabelece os requisitos para o registro e a renovação de registro de medicamentos específicos. Brasília, 2011.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Tenth Edition. CLSI document M07-A10, Wayne, Pennsylvania, USA, 2015.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Eleventh Edition. CLSI document M02-A1, Wayne, Pennsylvania, USA, 2012.

CORDEIRO, A. R. et al. Composição química de duas variedades de própolis dos campos gerais do Paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 5, n. 1, p.21-27, 2015.

DA SILVA, C. et al. Determination of total phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis using ATR–FT-IR spectroscopy and chemometrics. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, p. 2013-2021, 2018.

DE CASTRO, S.L. Propolis: Biological and pharmacological activies, therapeutic uses of this bee-product. **Annual Review of Biomedical Sciences,** v.3, p. 49-83, 2001.

DE CAMPOS, J.V. **Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.** São Carlos: UFSCar, 2017. p. 88. Dissertação de mestrado- Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 3, p. 186-199, 2010.

FERREIRA, V. U. **Avaliação do efeito anti-leucêmico de amostras de própolis de 4 municípios do Rio Grande do Sul**. 2014. 31p. Monografia [Graduação]. Universidade Federal do Pampa. São Gabriel, 2014.

FIKRI, A. M.; SULAEMAN, A.; MARLIYATI, S. A.; FAHRUDIN, M. Antiemetic Activity of *Trigona* spp. propolis from three provinces of Indonesia with two methods of extraction. **Pharmacognosy Journal**, v. 10, n. 1, p. 120-122, 2017.

FIORDALISI, S. A. I. et al. The effects of Brazilian propolis on etiological agents of mastitis and the viability of bovine mammary gland explants. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p.2308-2318, 2016.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phophomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. XII, p. 239-243, 1912.

FONTANA, J.D.; ALDEMANN, L.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; DE LACERDA, C. A.; LANÇAS, F. M. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: WALKER, J.M.; SPENCER, J.F.T.; SPENCER, A.L.R. (Ed.). **Environmental Microbiology. Methods and Protocols.** Editora Humana Press Inc., New Jersey, 2004. p.203-218.

FREIRES, I. A. et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 2, p.122-132, 2016.

GOMES, M. F. F. et al. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279-282, 2016.

HUANG, S. et al. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p.19610-19632, 2014.

JIANG, Y. et al. Chrysin supppressed inflammatory responses and the inducible nitric oxide synthase pathway after spinal cord injury in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12270-12279, 2014.

KADOSAKI, L. L.; SOUSA, S. F.; BORGES, J. C. M. Análise do uso e da resistência bacteriana aos antimicrobianos em nível hospitalar. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.93, n. 2, p. 128-135., 2012.

KIM, D-O.; LEE, K.W.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

KONISHI, S. et al. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. **Mensagem Doce**, n. 75, p. 22-25, 2004.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LEE, S.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p.131-137, 2005.

LOPES, R. et al., Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 18-22, 2000.

LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis, **Food Chemistry**, v. 146, n. 1, p. 174-180, 2014.

LUCA, M. P. de et al. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. **Biomed Research International**, p.1-6, 2014.

LUSTOSA, S. R. et al. Própolis: atualização sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, 2008.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil, **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 1-26, 2016.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de BROCK.** 10° ed. São Paulo: Prentice Hall brasil, 2004. 624 p.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova.** v.19, n. 5, p.529-536, 1996.

MORADKHANNEJHAD, L. et al. Electrospinning of zein/propolis nanofibers; antimicrobial properties and morphology investigation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 11, p.2-10, 2018.

MOREIRA, J.L.B.; CARVALHO, C.B.M.C.; FROTA, C.C. **Visualização Bacteriana e colorações.** Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC), 2015. 67 p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2° ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

NASCIMENTO, E. A. et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

NAKAJIMA, Y. et al. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1-9, 2009.

OMS Organização Mundial da Saúde. 2010. Advertência sobre doenças resistentes a medicamentos. Disponível em:< http://unicrio.org.br/oms-adverte-sobre-doencas-resistentes-a-medicamentos/> Acesso em: 15 abr.2020.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellífera***. 2007, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ORSI, R. O. et al. The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against *Salmonella Typhi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. **Natural Product Research**, v. 26, n. 5, p. 430-437, 2012.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 469-483, 2018.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian Propolis**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p.1100-1103, 2004.

PASUPULETI, V. R. et al. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.1-21, 2017.

PEGORARO, A. et al. **Aspectos práticos e técnicos da apicultura no Sul do Brasil**. 2017. 282p. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2017. Disponível em: <http://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/45536/Aspectos%20pr%C3%A1ticos%20e%20t%C3%A9cnicos%20da%20apicultura%20no%20Sul%20do%20Brasil.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 24 abr. 2020

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de Pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 11, n. 2, p. 01-21, 2015.

PEREIRA, I. N. **Própolis: matéria-prima de potencial aplicação farmacêutica**. 2013. 49 p. Dissertação (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2011.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.8, n. 3, p.76 - 100, 2011.

POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review**. Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p.53-62, 2019.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical Cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RISTIVOJEVIĆ, P. et al. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities, **LWT - Food Science and Technology,** *v.* 95, p. 367–379, 2018.

SALATINO, A et al., Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, v.28, n.5, p.925-936, 2011.

SALAZAR, G.J.T. et al. Phytochemical characterization of the Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 122, p. 591-595, out. 2018. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.052.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurina vas an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods.** v. 42, p. 321–324, 2007.

SILVA, R. P*. et al*. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. 1-18, 2017.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p.253-260, 2011.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 6, p.894-905, 2016.

SHIMIZU, T. et al. efficacy of Brazilian propolis against herpes simplex virus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-9, 2011.

SOARES, A. L. F. et al. Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis.

Revista Gestão em Foco, n. 9, p. 255-275, 2017.

SOUZA, J. A.; SOUZA, E. F. M.; MODRO, A. F. H.; PORTO, W. S.; OLIVEIRA, D. L. A apicultura em Rondônia (Amazônia legal): estudo de caso sobre o arranjo produtivo local da apicultura no cone sul. **Revista Estudo & Debate**, v. 23, n. 2, p. 115-137, 2016.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science,** v.30, p. 3268-3295, 2007.

SUN, C. et al. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2015.

TASHO, R. P.; CHO, J. Y. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: a review. **Science of the Total Environment**, v. 563-564, p. 366-376, 2016.

TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. **Plos One**, v. 11, n. 11, p. 1-11, 2016.

TORETI, V. C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-13, 2013.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia.** 10°. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.

URUSHISAKI, T. et al. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in Brazilian green propolis water extract. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-7, 2011.

VASILAKI, A.; HATZIKAMARI, M.; STAGKOS-GEORGIADIS, A.; GOULA, A. M.; MOURTZINOS, I. A. natural approach in food preservation: propolis extract as sorbate alternative in non-carbonated beverage. **Food Chemistry**, v. 298, p. 125080-0, 2019.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.

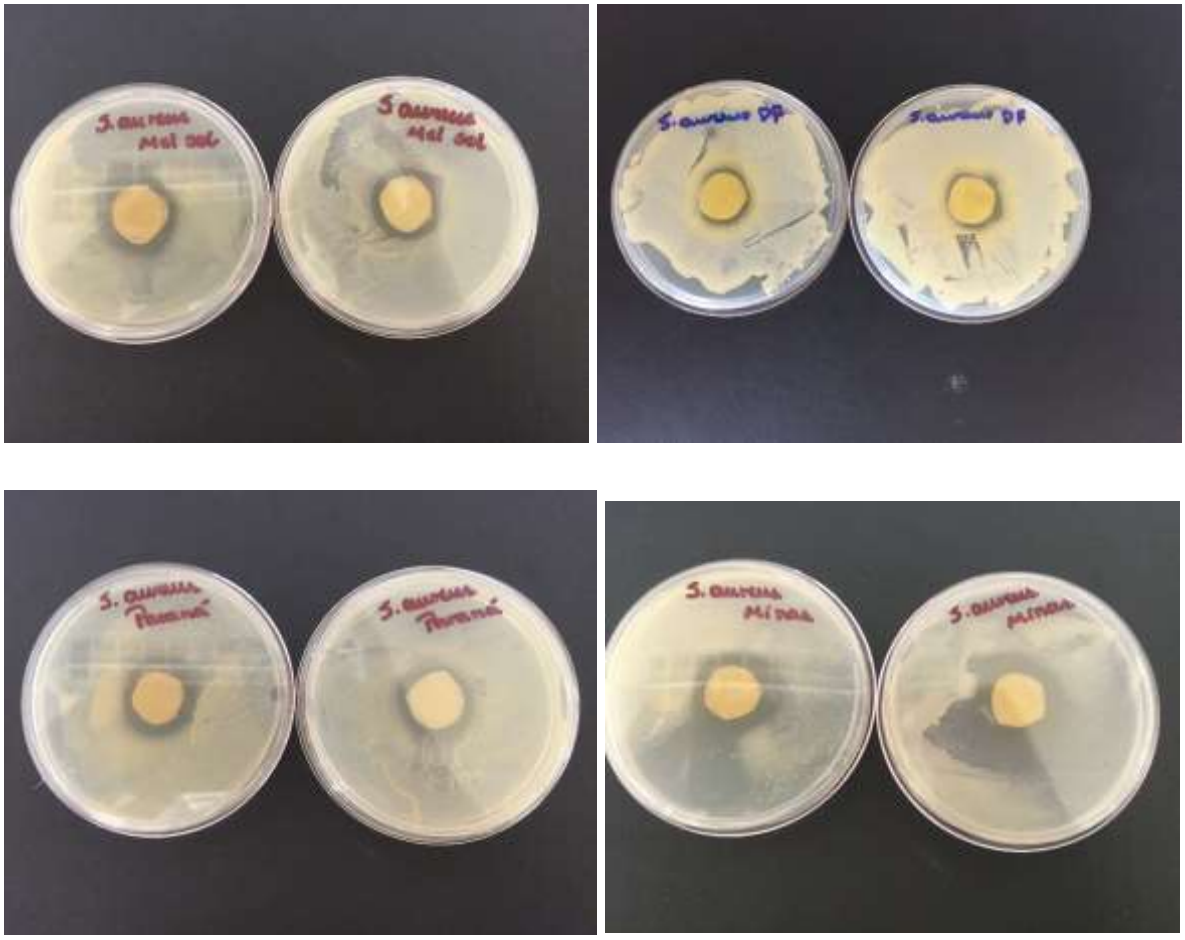
YUAN, M. et al. A comparative study between Chinese propolis and Brazilian green propolis: metabolite profile and bioactivity. **Food & Function**, v. 11, n. 3, p. 2368-2379, 2020.

WEBSTER, D. et al. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

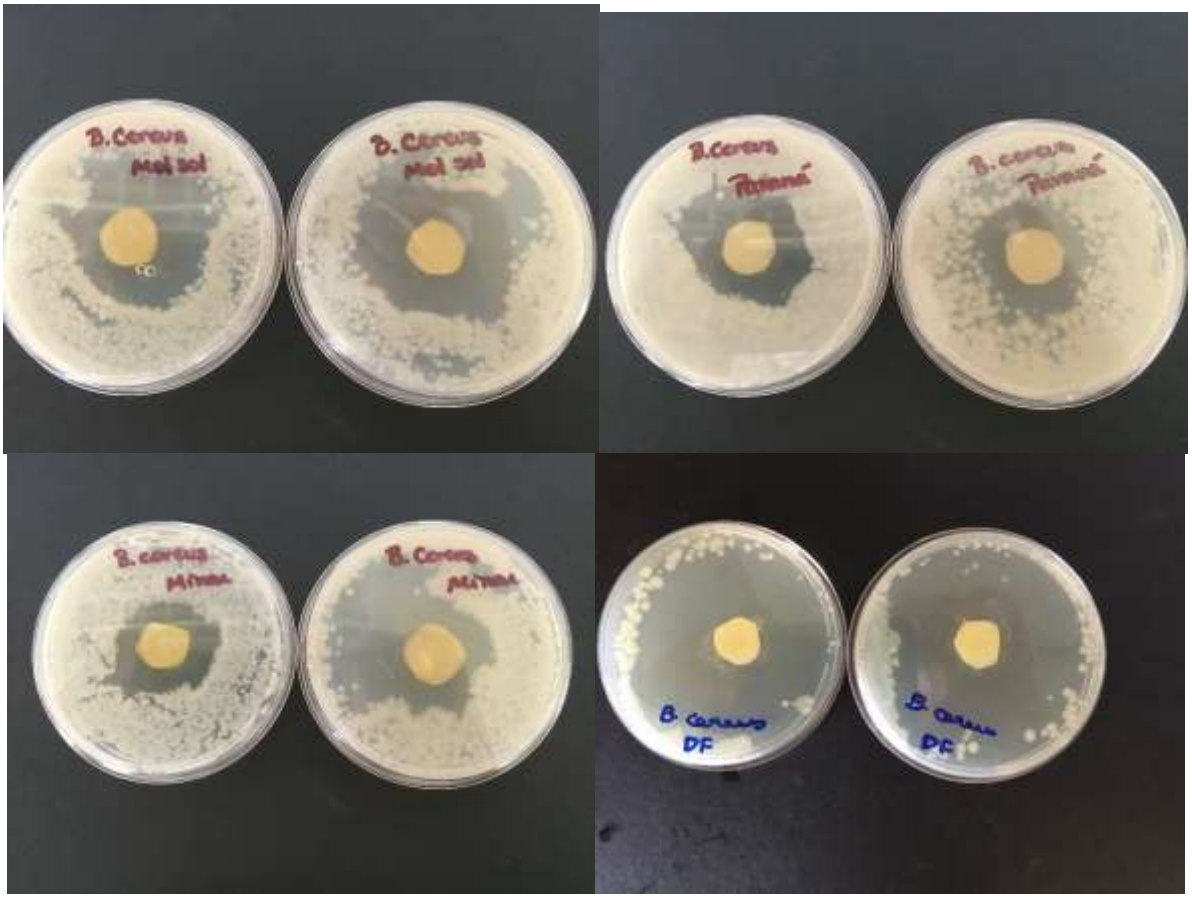
ZABAIOU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; LOBACCARO, J. A. Biological properties of propolis extracts**:** Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p.214-222, 2017.

ANEXOS

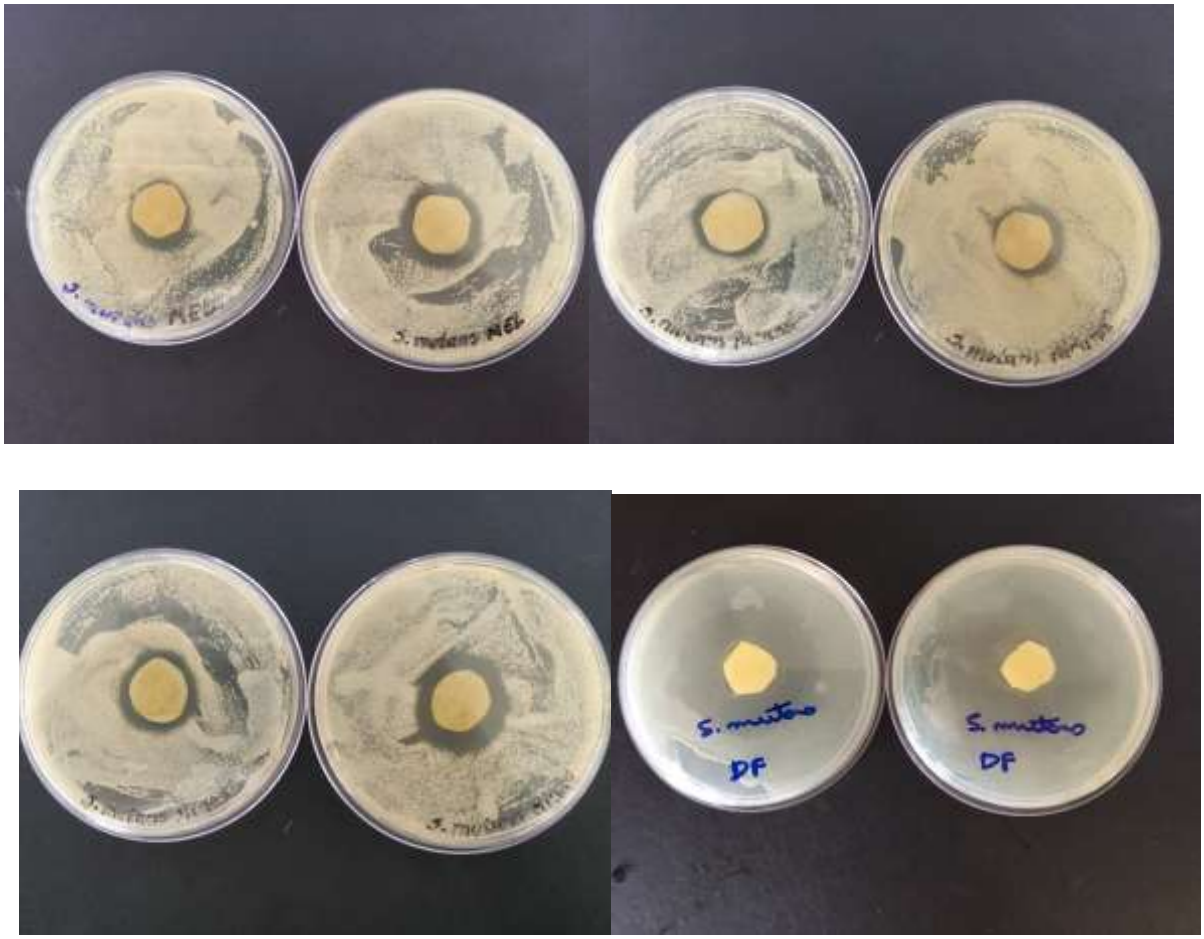
ANEXO 1 - Atividade antimicrobiana por ensaio de difusão em disco



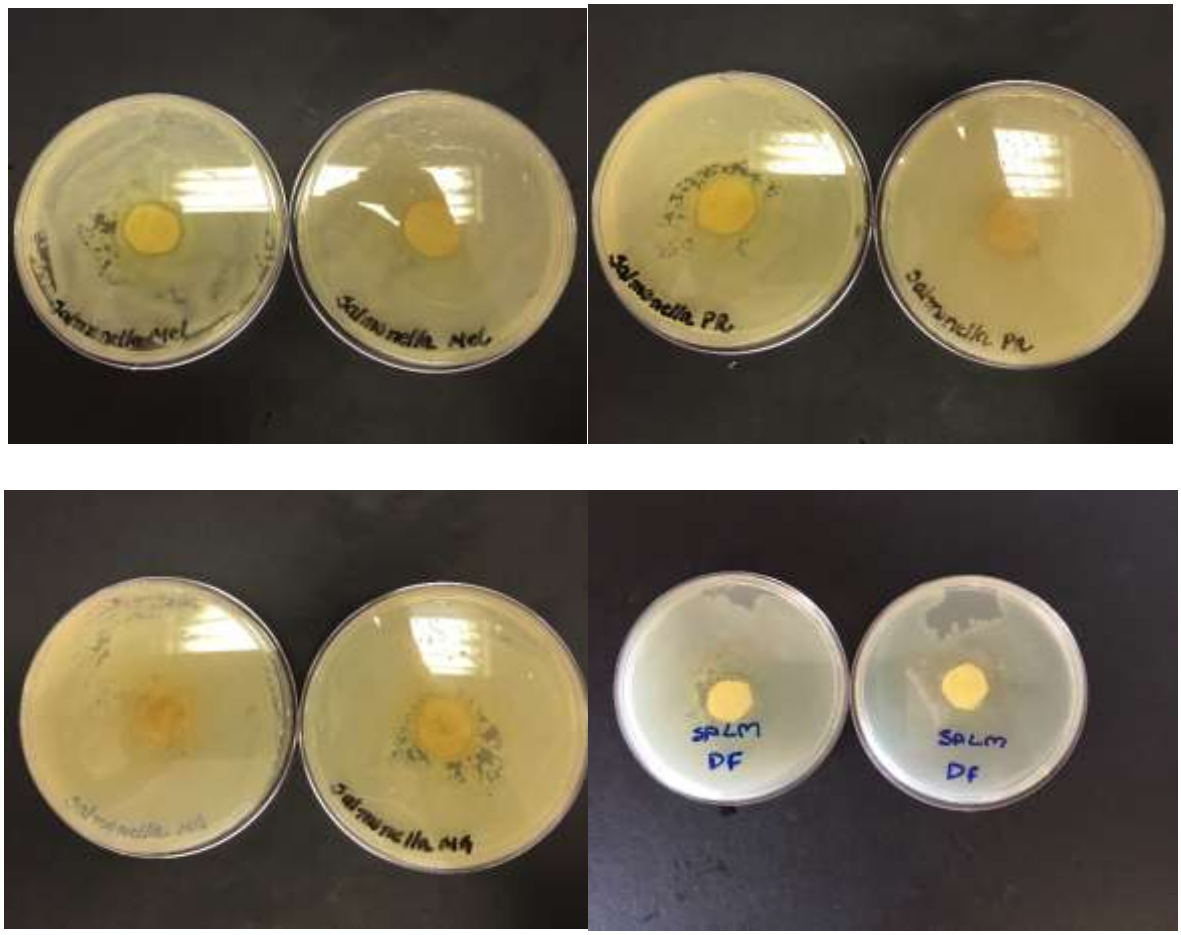
ANEXO 1.1 - Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis: verde MEL do SOL, verde DF, verde Apiário do Vovô PR, verde Apiário do Vovô MG.



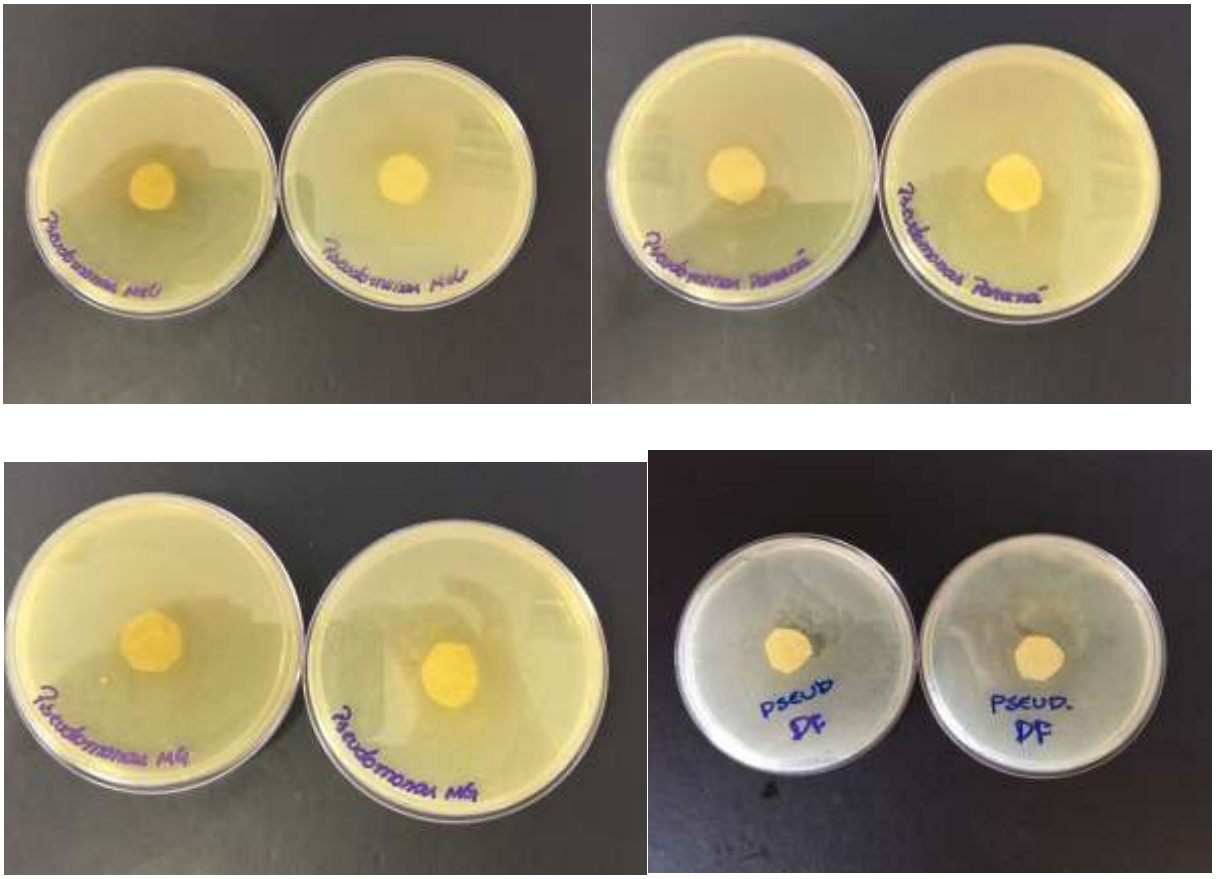
ANEXO 1.2 - Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis: verde MEL do SOL, verde Apiário do Vovô PR, verde Apiário do Vovô MG e verde DF



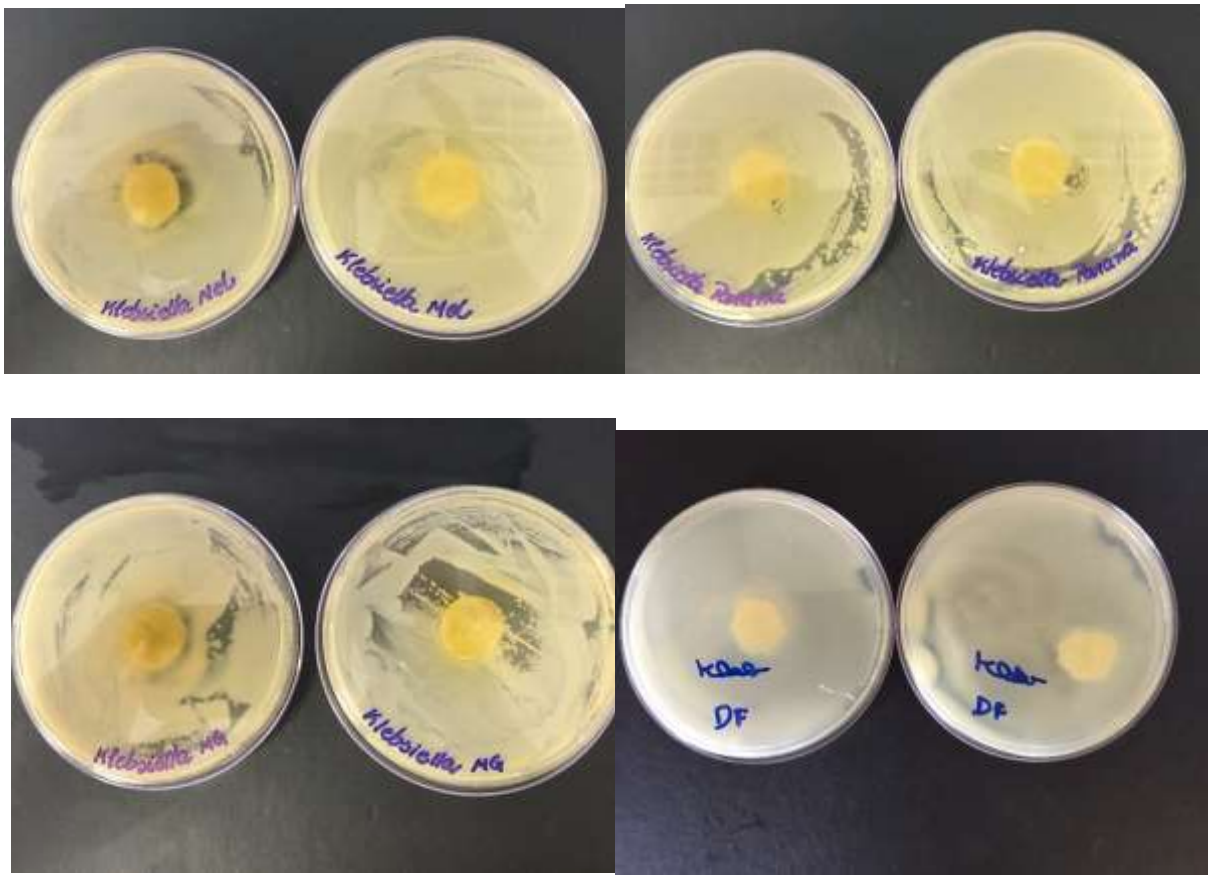
ANEXO 1.3 - Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis: verde MEL do SOL, verde Apiário do Vovô PR, verde Apiário do Vovô MG e verde DF



ANEXO 1.4 - Imagens das placas com *S. enteritidis* ATCC 14028 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis: verde MEL do SOL, verde Apiário do Vovô MG, verde Apiário do Vovô PR e verde DF

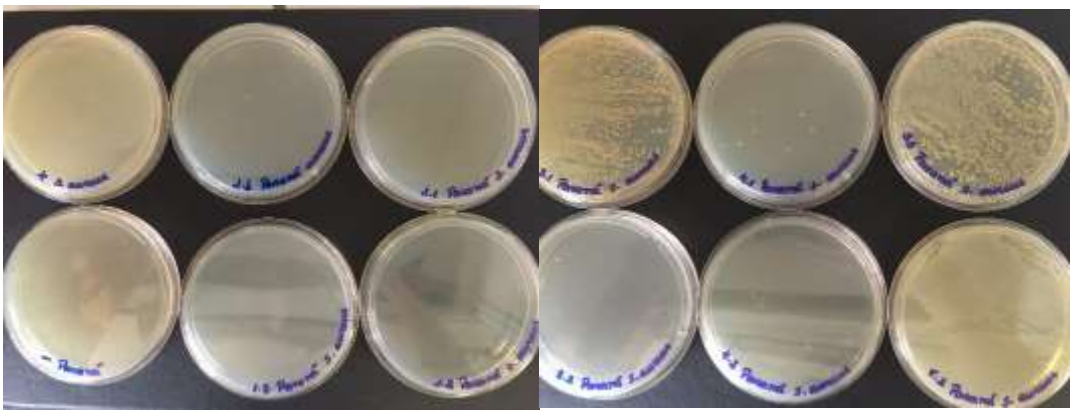


ANEXO 1.5 - Imagens das placas com *P. aeruginosa* ATCC 27853 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis: verde MEL do SOL, verde Apiário do Vovô MG, verde Apiário do Vovô PR e verde DF



ANEXO 1.6 - Imagens das placas com *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em disco dos extratos de própolis: verde MEL do SOL, verde Apiário do Vovô MG, verde Apiário do Vovô PR e verde DF

ANEXO 2 – CBM

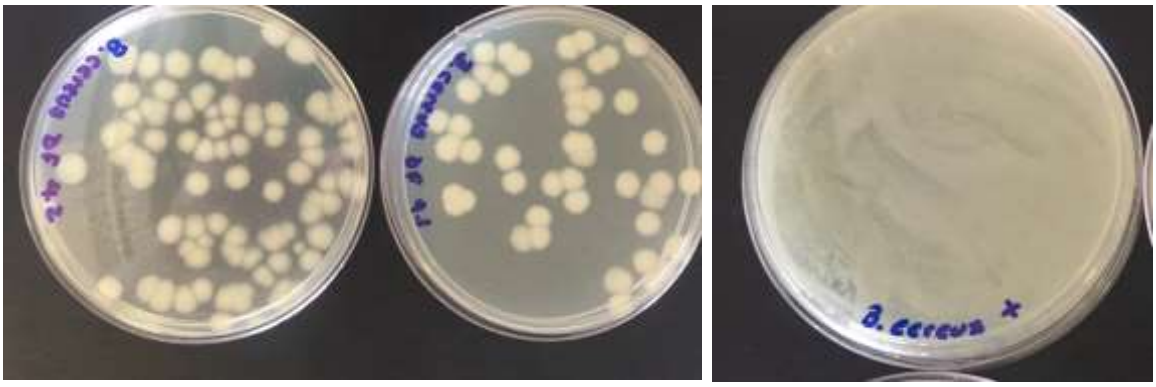


ANEXO 2.1 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Paraná: 1- 12 mg/mL; 2- 10 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

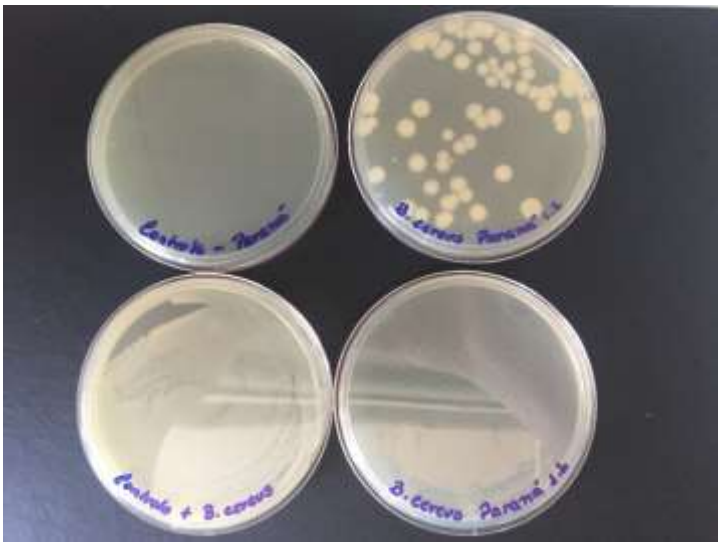
ANEXO 2.2 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Minas Gerais: 1- 12 mg/mL; 2- 10 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

ANEXO 2.4 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF: 1- 12 mg/mL; 2- 10 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

ANEXO 2.5 – Imagens das placas com *S. aureus* ATCC 25923 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde MEL DO SOL: 1- 12 mg/mL; 2- 10 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

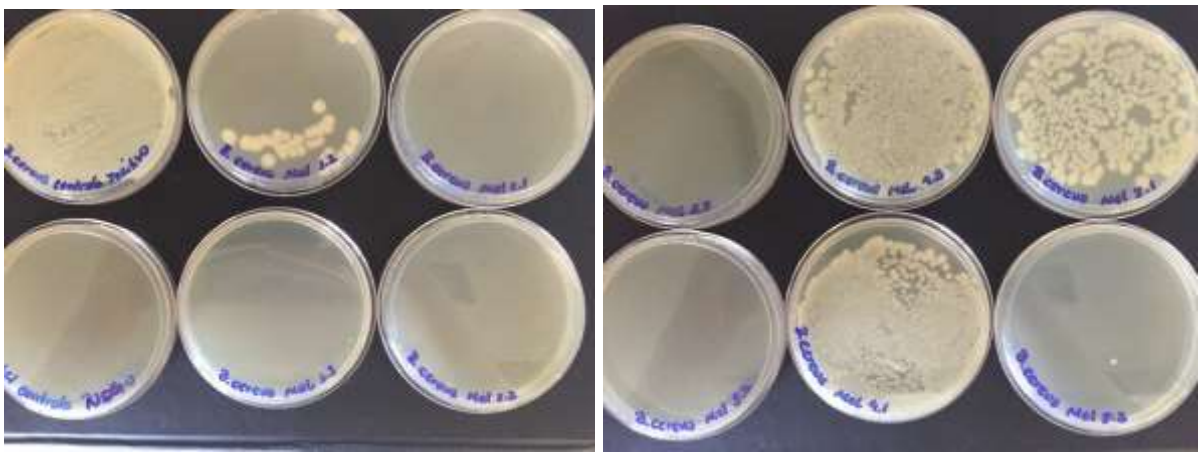


ANEXO 2.6 – Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF: 4- 1,5 mg/mL; (+) = controle positivo.

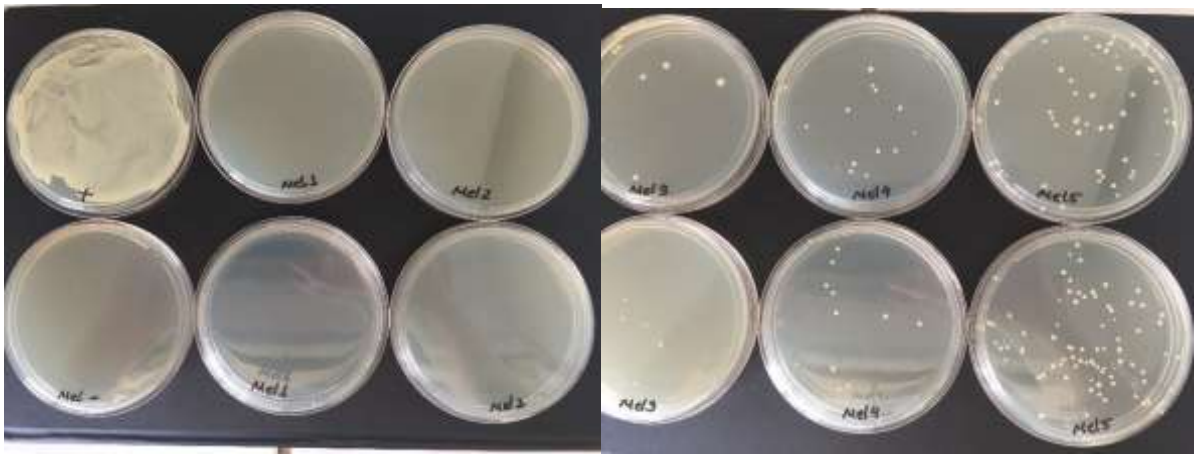


ANEXO 2.7 – Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Paraná: 1- 2,0 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

ANEXO 2.8 – Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Minas Gerais: 1- 2,0 mg/mL; 2- 1,5 mg/mL; 3- 1,25 mg/mL; 4- 1,0 mg/mL; 5- 0,75 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



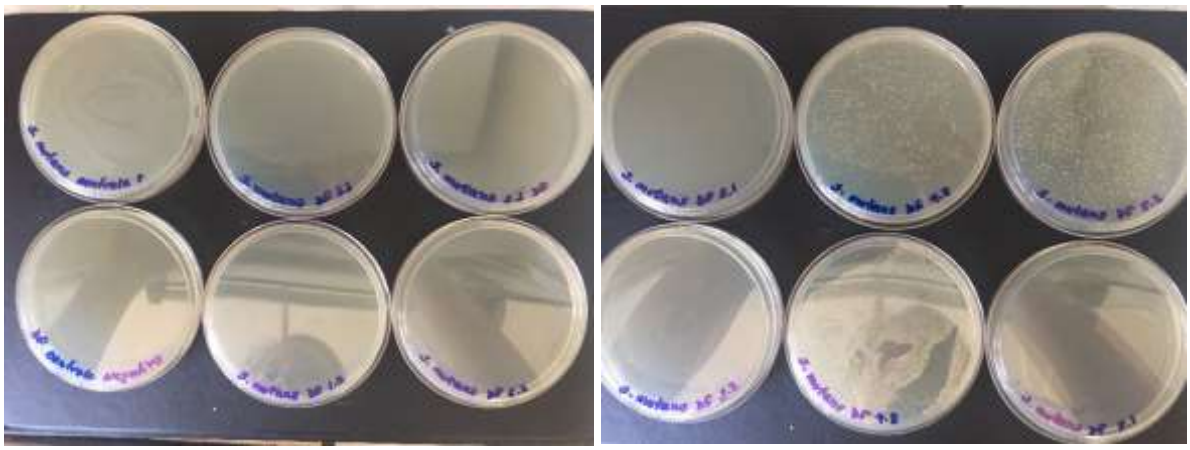
ANEXO 2.9 – Imagens das placas com *B. cereus* ATCC 14579 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde MEL DO SOL: 1- 2,0 mg/mL; 2- 1,5 mg/mL; 3- 1,25 mg/mL; 4- 1,0 mg/mL; 5- 0,75 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



ANEXO 2.10 – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde MEL do SOL: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

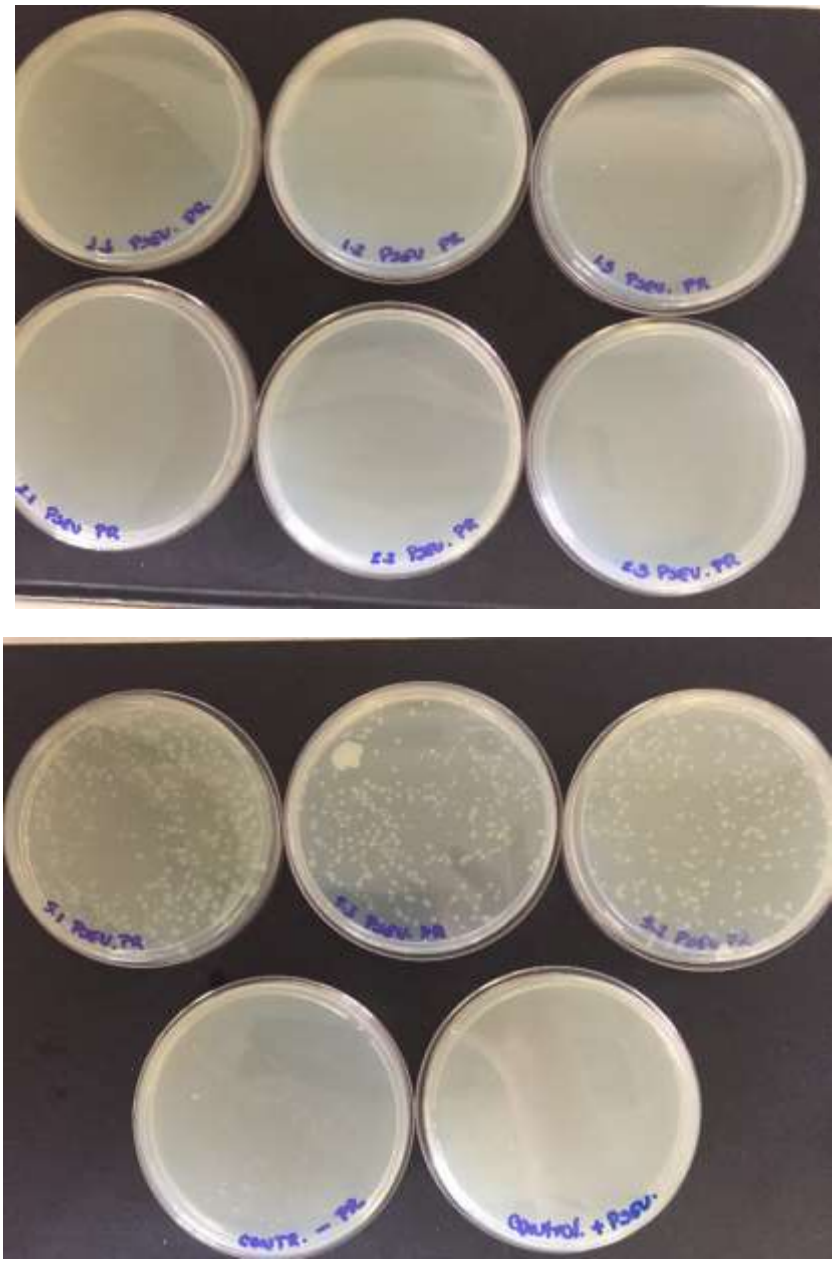
ANEXO 2.11 – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis, verde Apiário do Vovô PR: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

ANEXO 2.12 – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis, verde Apiário do Vovô MG: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

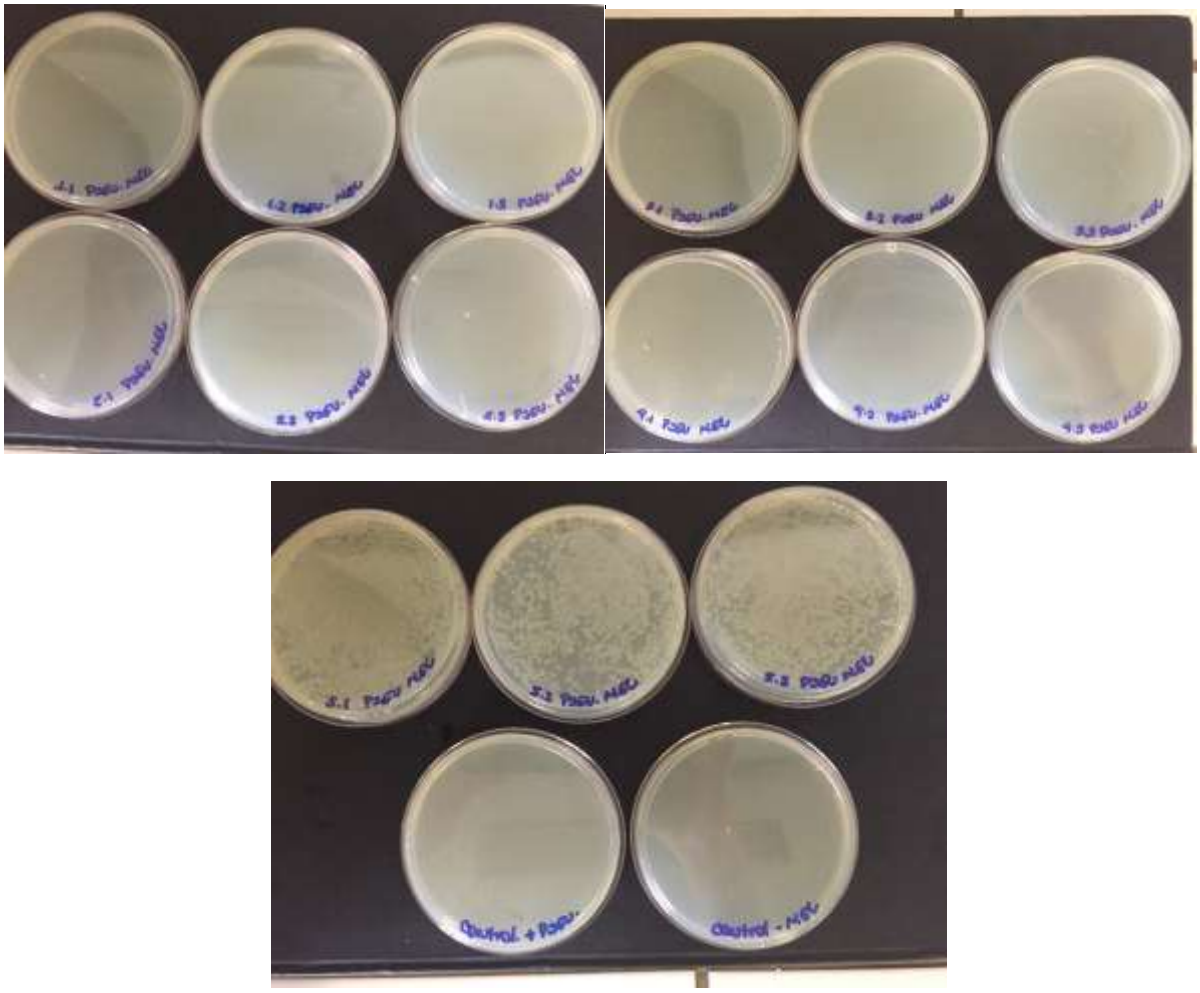


ANEXO 2.13 – Imagens das placas com *S. mutans* ATCC 25175 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis, verde DF: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 9 mg/mL; 4- 6 mg/mL; 5- 4 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

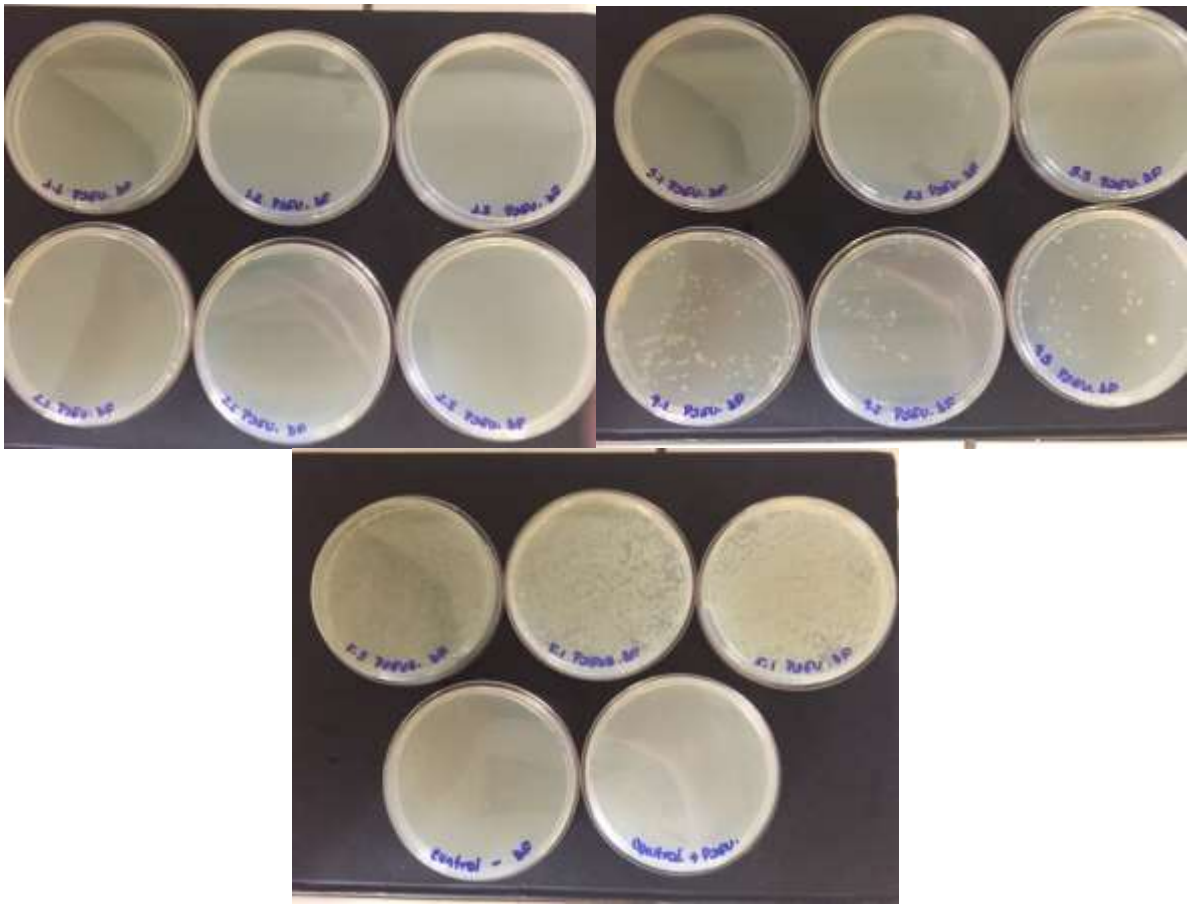
ANEXO 3– CBM das bactérias Gram-negativas



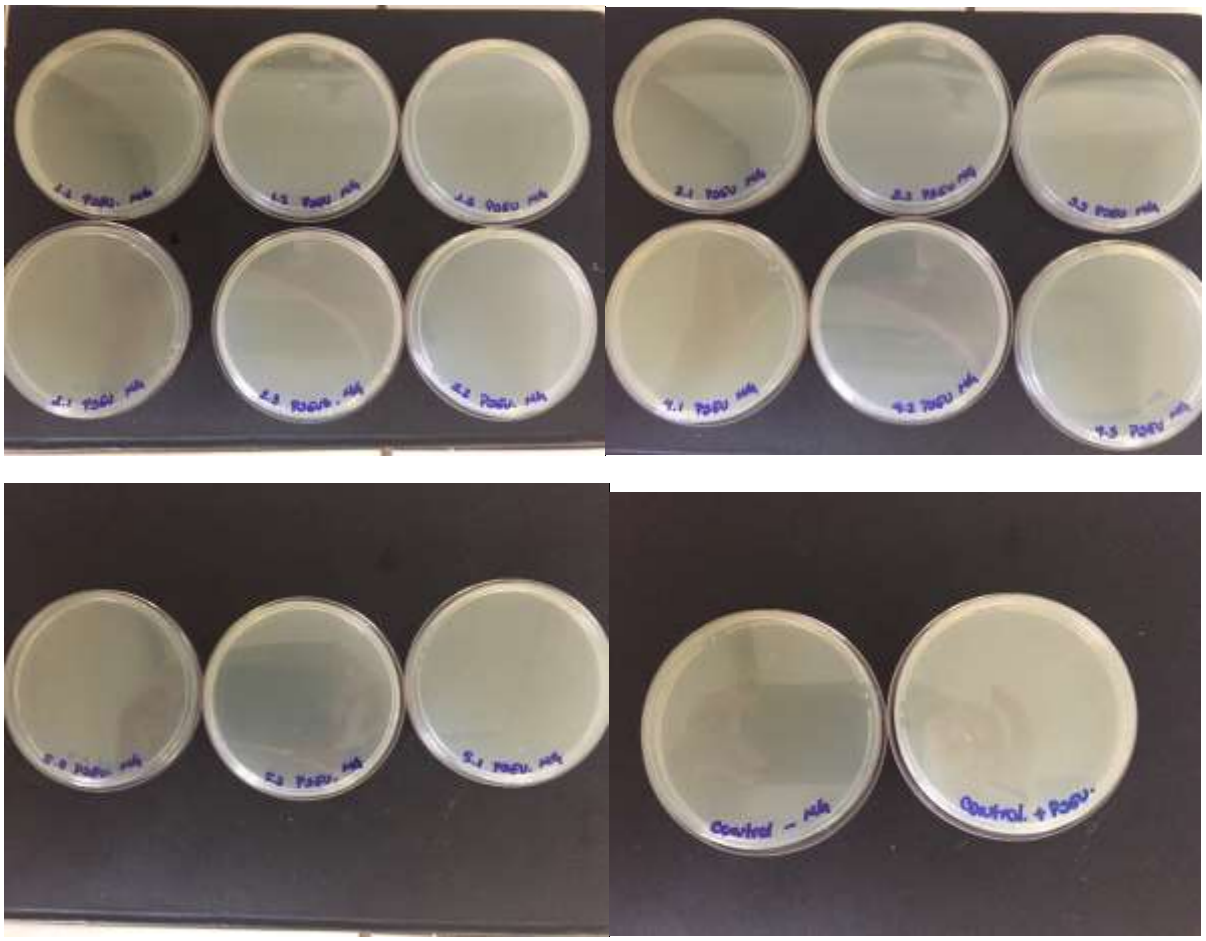
ANEXO 3.1 – Imagens das placas com *P. aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Paraná: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



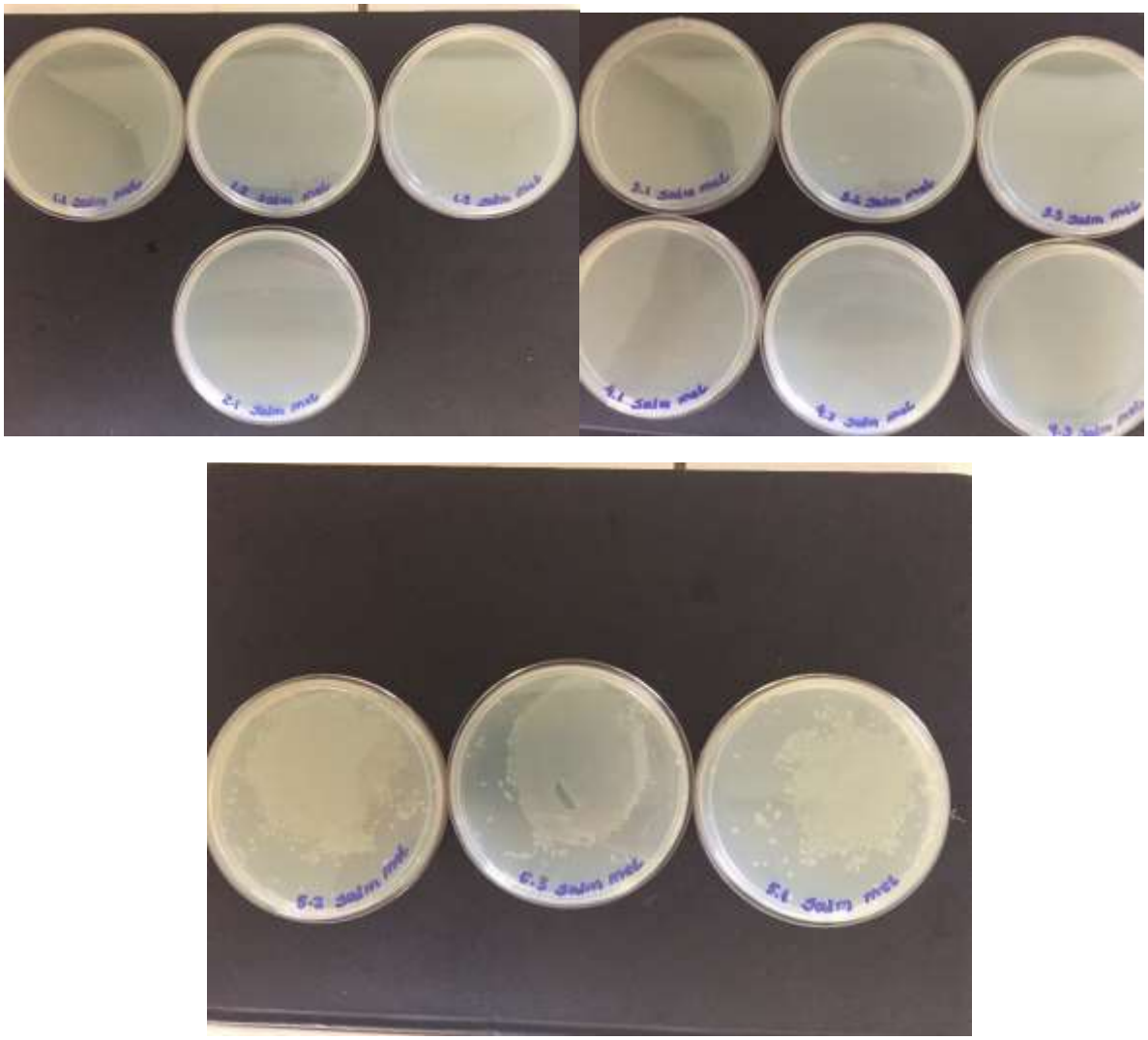
ANEXO 3.2 – Imagens das placas com *P. aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde MEL do SOL: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.



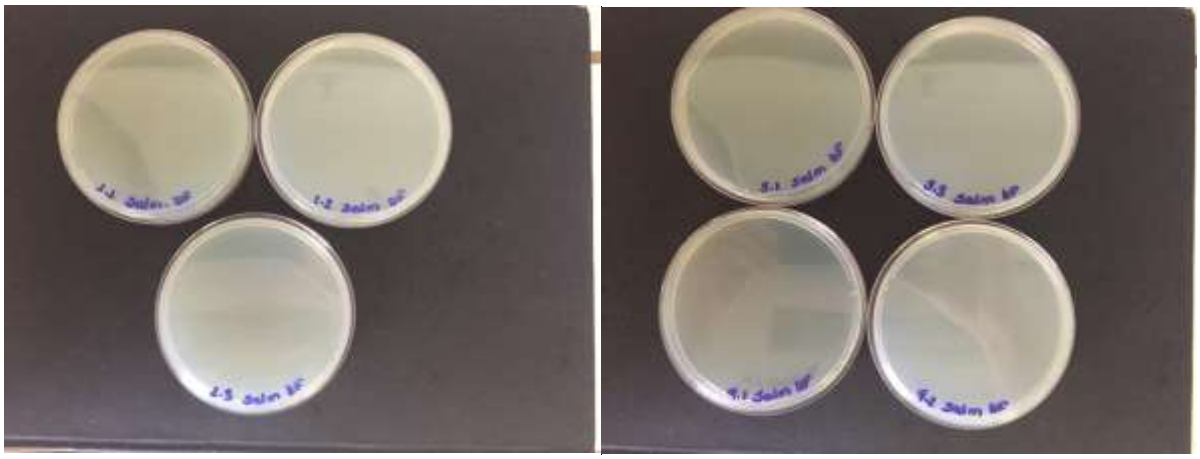
ANEXO 3.3 – Imagens das placas com *P. aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

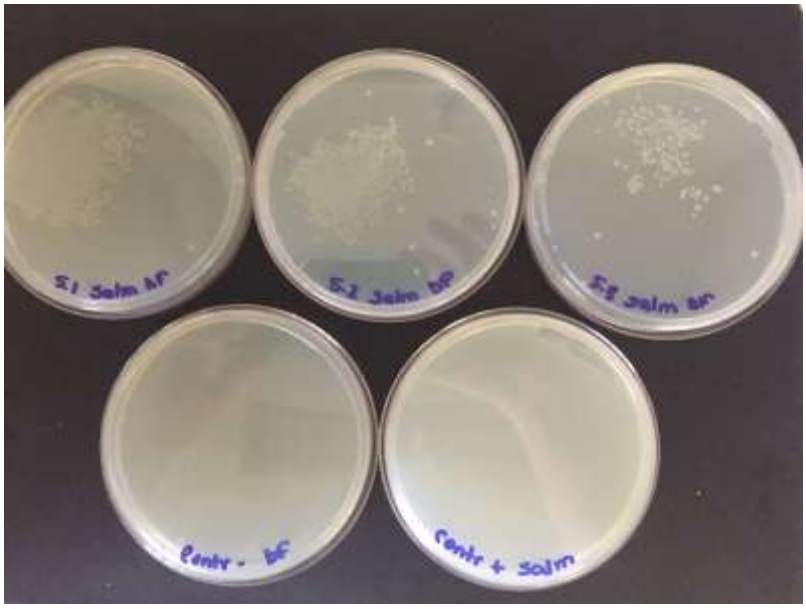


ANEXO 3.4 – Imagens das placas com *P. aeruginosa* ATCC 27853 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Minas Gerais: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

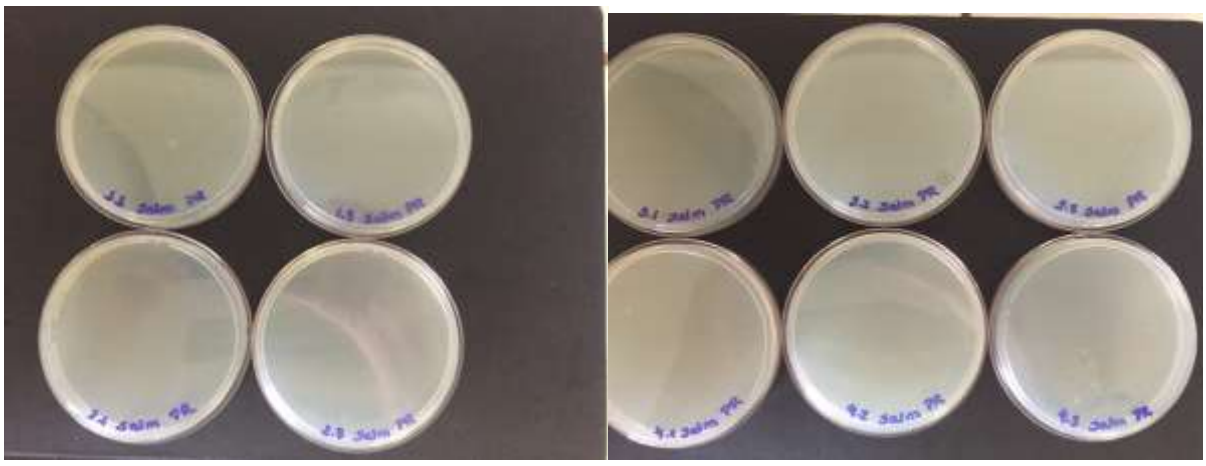


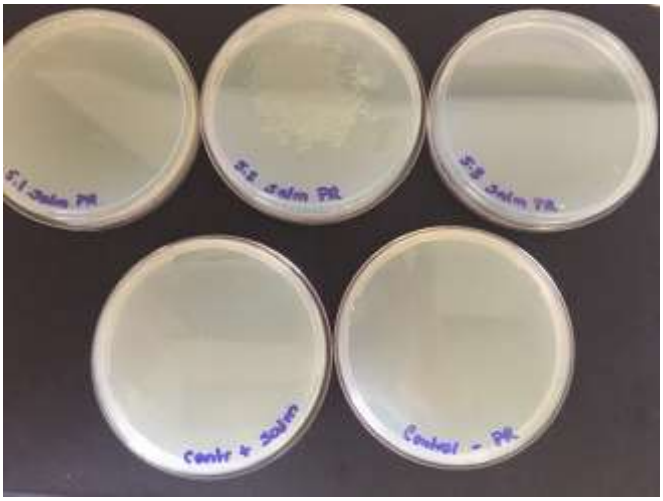
ANEXO 3.5 – Imagens das placas com *S. enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde MEL do SOL: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.





ANEXO 3.6 – Imagens das placas com *S. enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

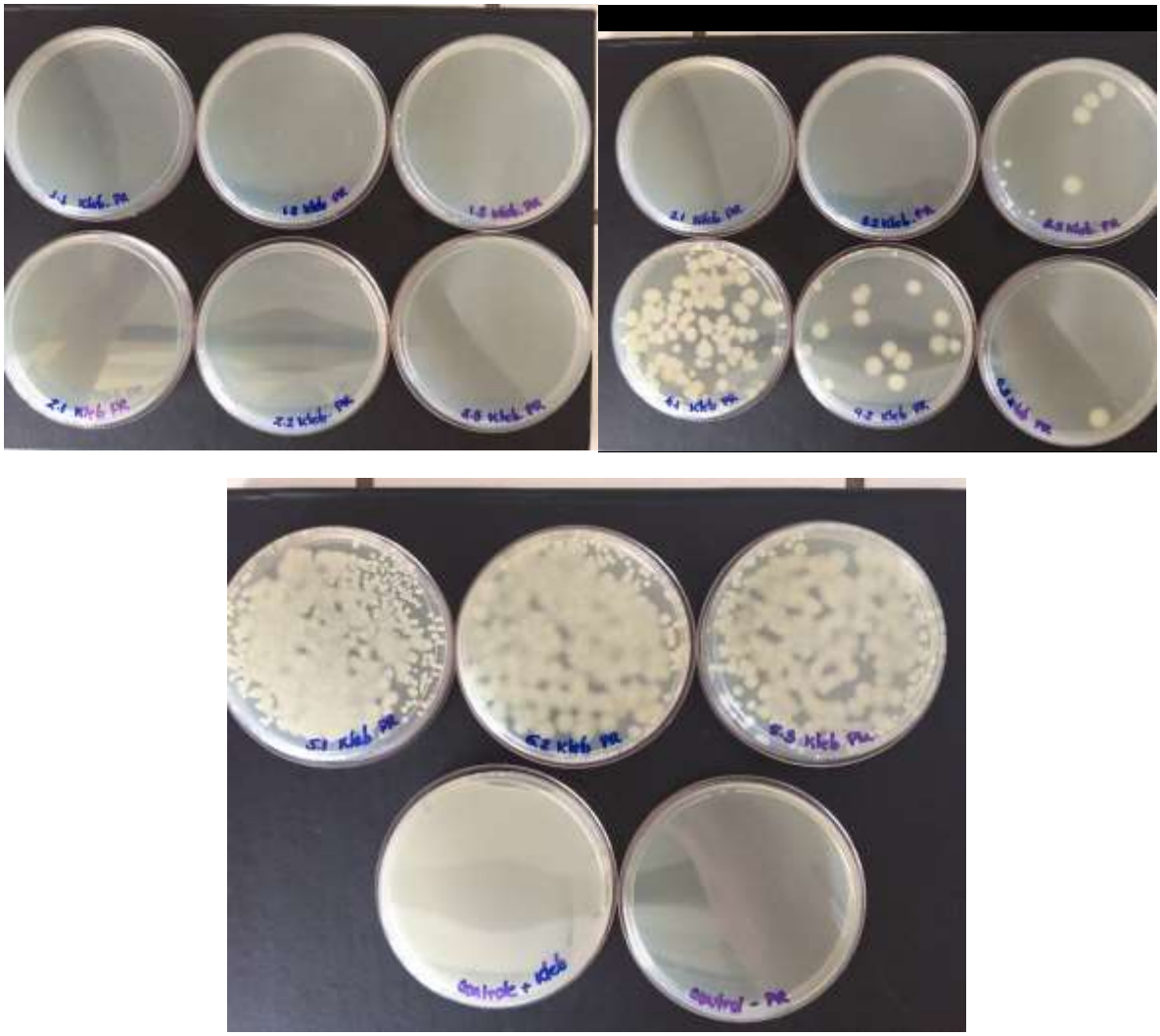




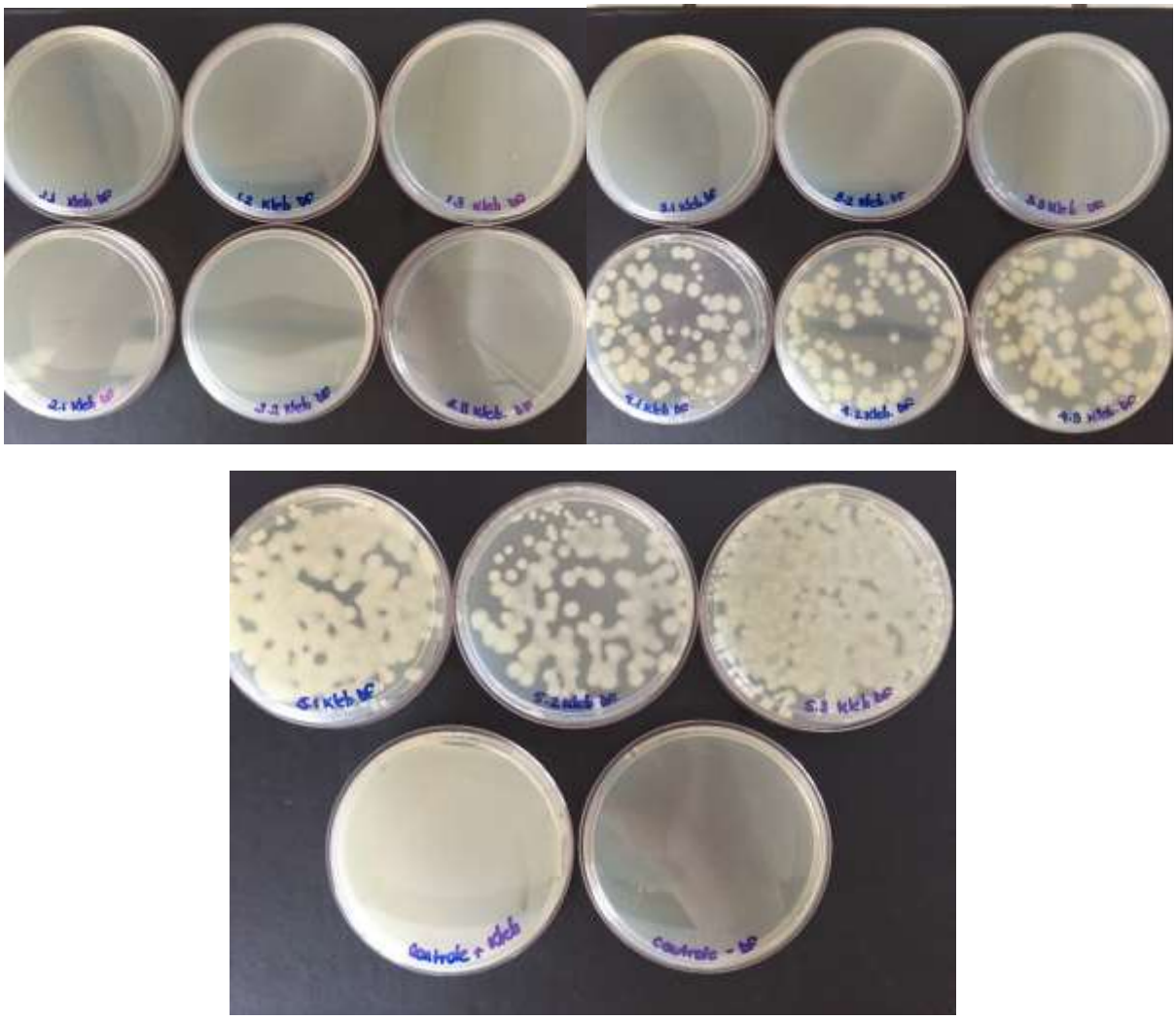
ANEXO 3.7 – Imagens das placas com *S. enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Paraná: 1- 60 mg/mL; 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo.

ANEXO 3.8 – Imagens das placas com *S. enterica* ATCC 14028 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Minas

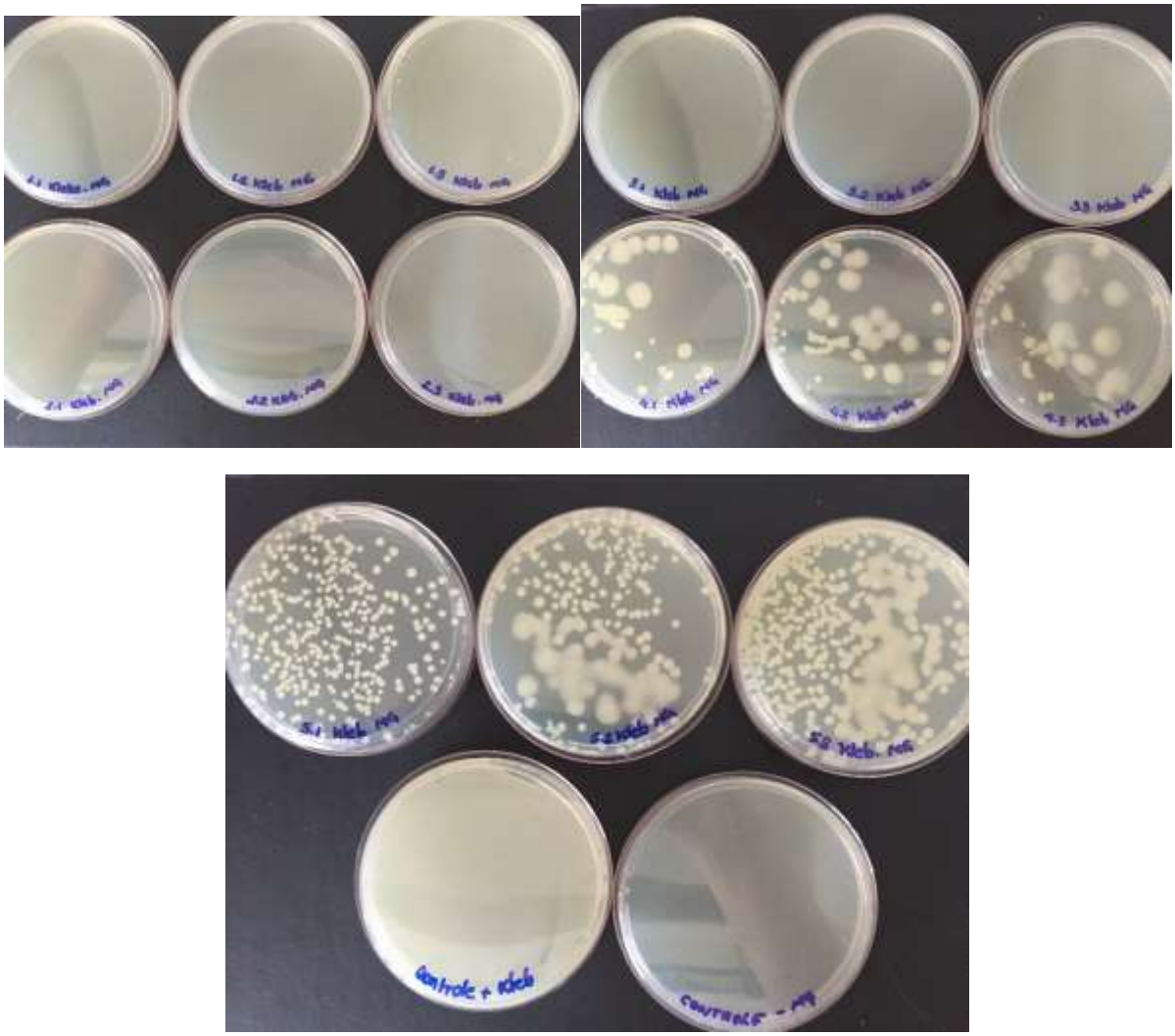
Gerais: 2- 30 mg/mL; 3- 20 mg/mL; 4- 15 mg/mL; 5- 12 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo



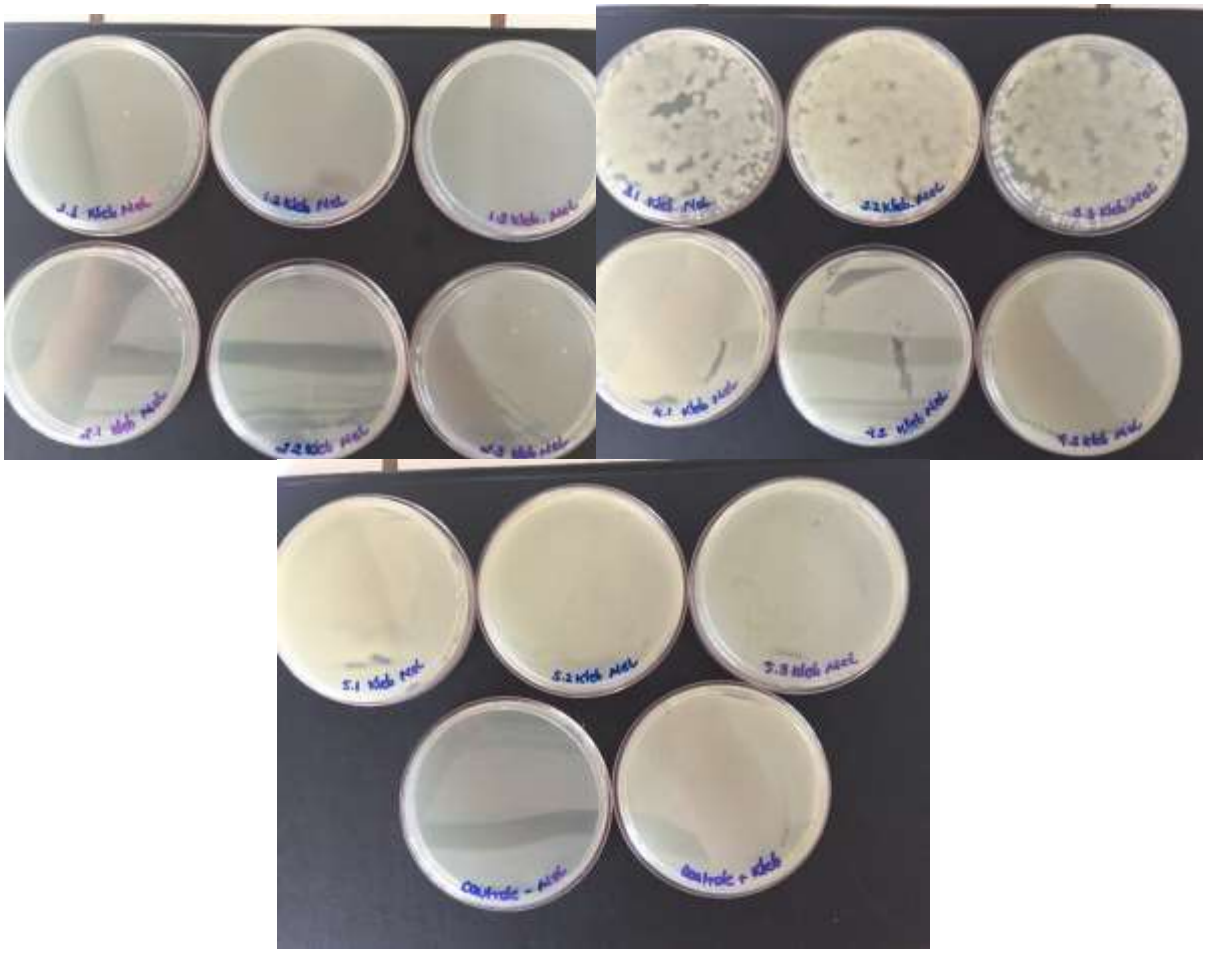
ANEXO 3.9 – Imagens das placas com *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô Paraná: 1- 30 mg/mL; 2- 20 mg/mL; 3- 15 mg/mL; 4- 12 mg/mL; 5- 10 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo



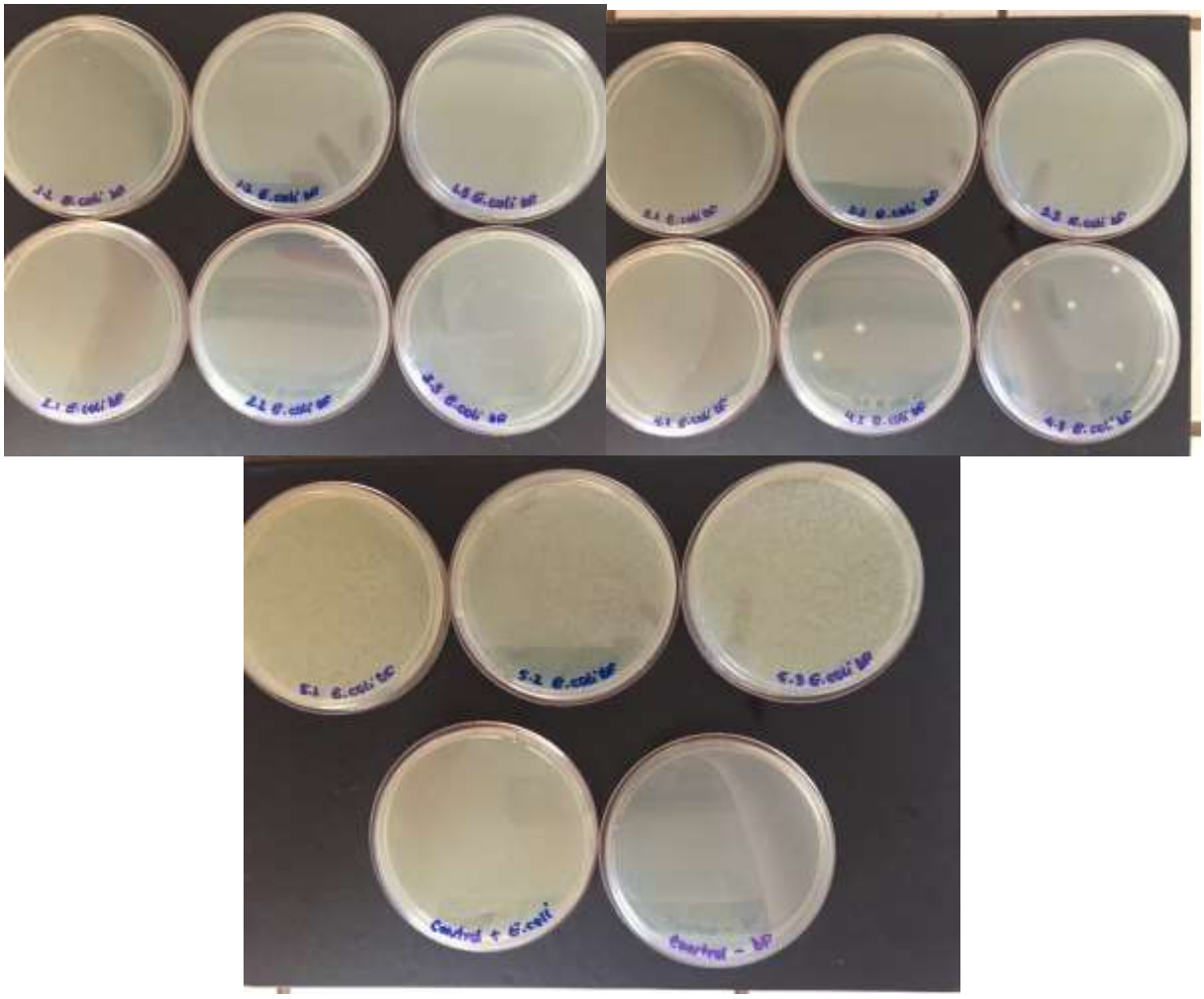
ANEXO 3.10 – Imagens das placas com *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF: 1- 30 mg/mL; 2- 20 mg/mL; 3- 15 mg/mL; 4- 12 mg/mL; 5- 10 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo



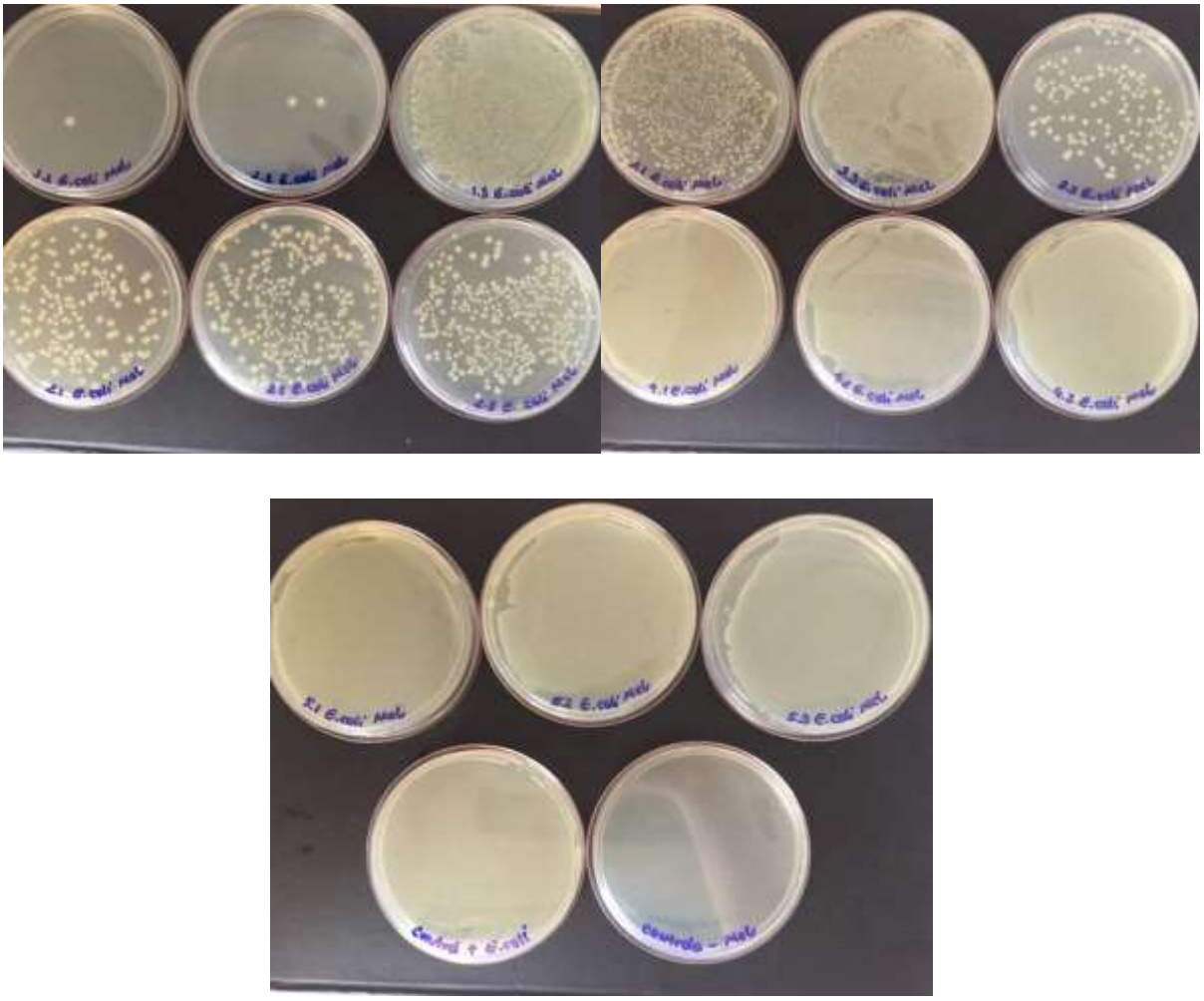
ANEXO 3.11 – Imagens das placas com *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô MG: 1- 30 mg/mL; 2- 20 mg/mL; 3- 15 mg/mL; 4- 12 mg/mL; 5- 10 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo



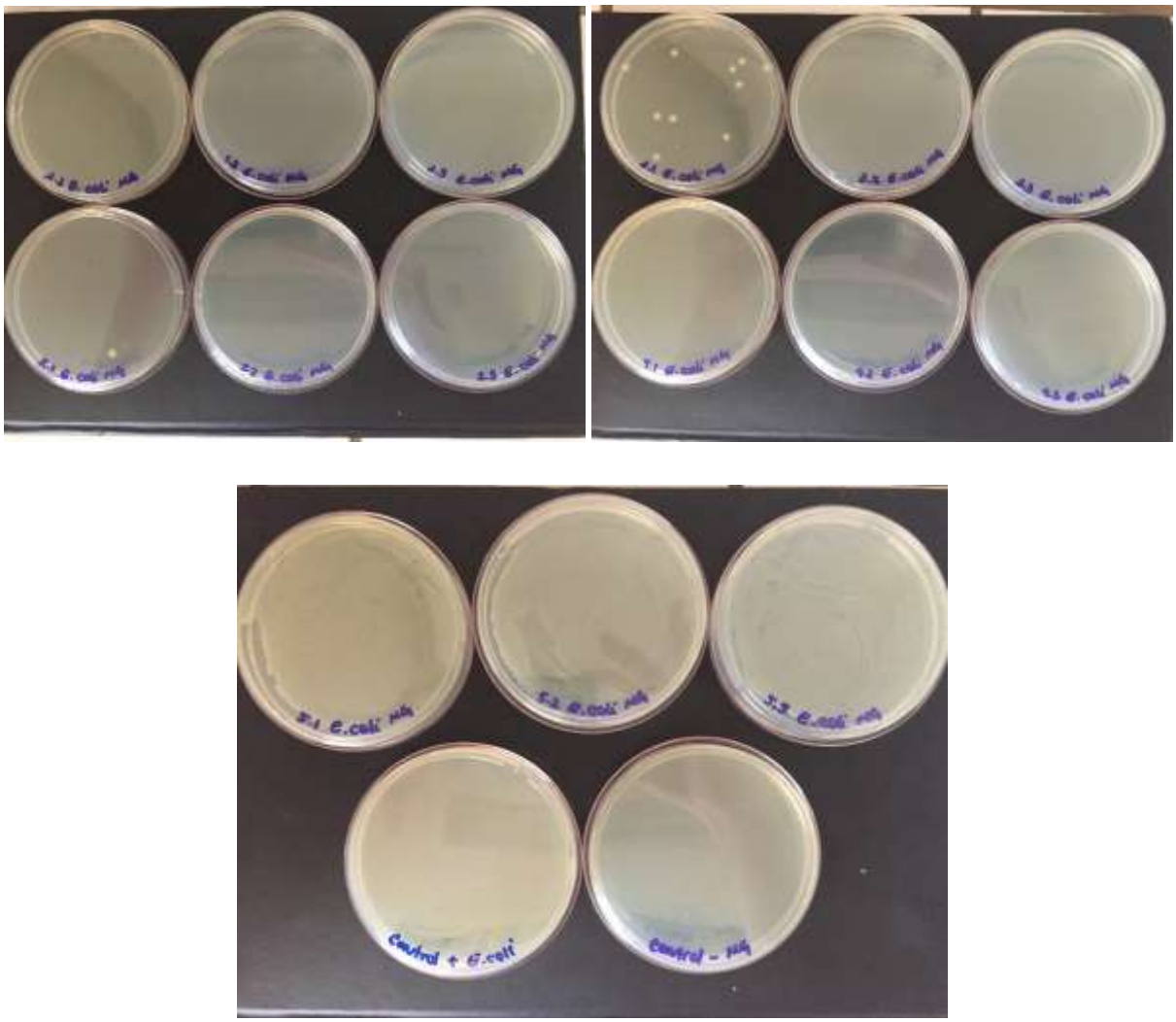
ANEXO 3.12 – Imagens das placas com *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde MEL DO SOL: 1- 30 mg/mL; 2- 20 mg/mL; 3- 15 mg/mL; 4- 12 mg/mL; 5- 10 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo



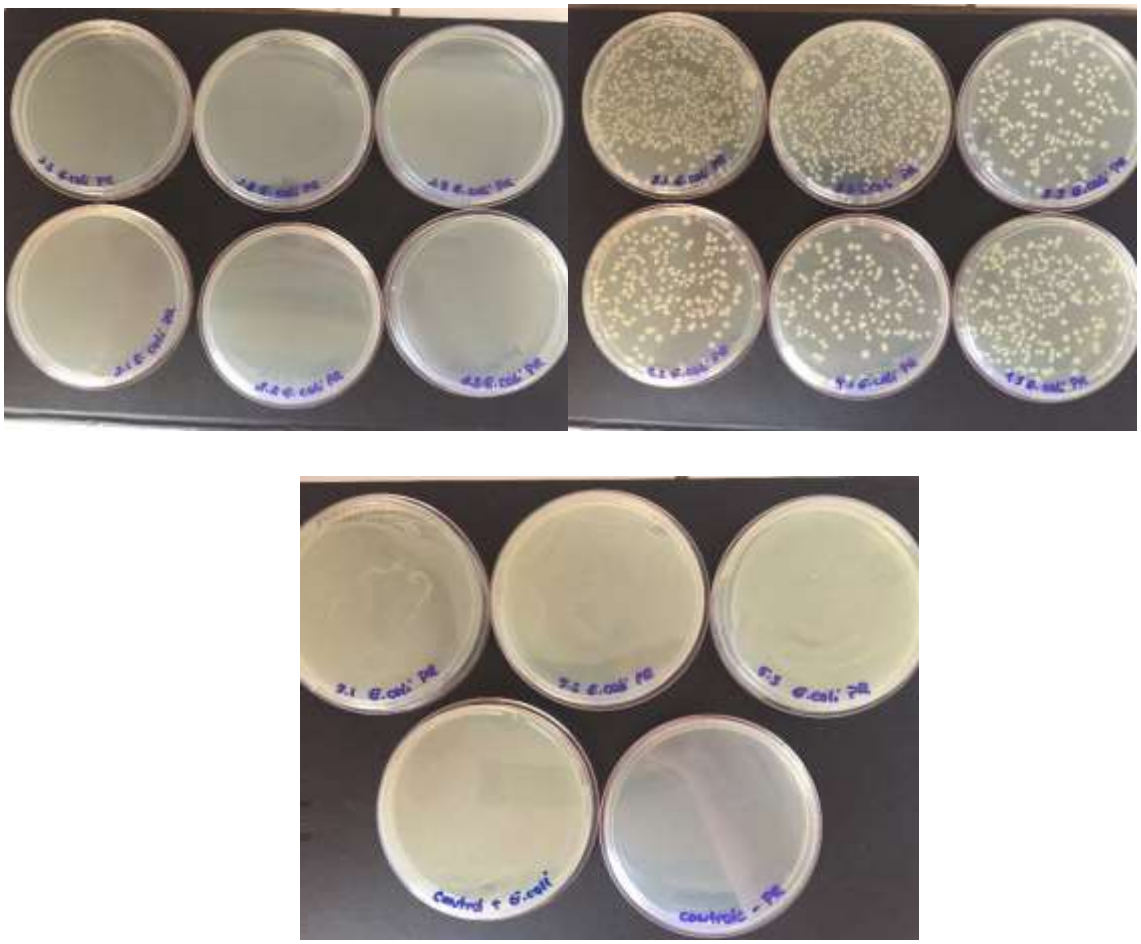
ANEXO 3.13 – Imagens das placas com *E. coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde DF: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 10 mg/mL; 4- 9 mg/mL; 5- 6 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo



ANEXO 3.14 – Imagens das placas com *E. coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde MEL DO SOL: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 10 mg/mL; 4- 9 mg/mL; 5- 6 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo

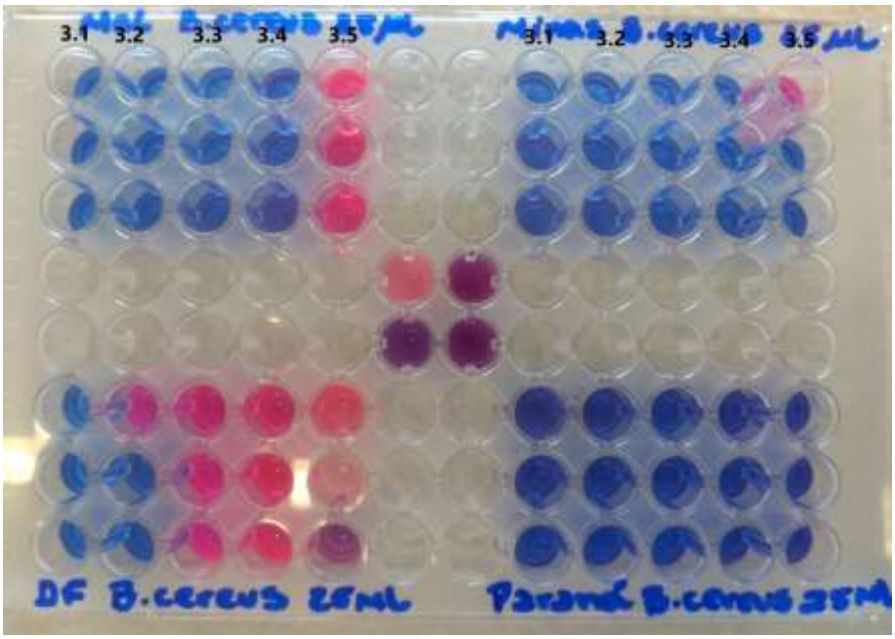


ANEXO 3.15 – Imagens das placas com *E. coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô MG: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 10 mg/mL; 4- 9 mg/mL; 5- 6 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo



ANEXO 3.15 – Imagens das placas com *E. coli* ATCC 25922 após tratamento com diferentes diluições do extrato de própolis verde Apiário do Vovô PR: 1- 15 mg/mL; 2- 12 mg/mL; 3- 10 mg/mL; 4- 9 mg/mL; 5- 6 mg/mL; (+) = controle positivo e (-) = controle negativo

ANEXO 4 – CIM



ANEXO 4.1. Imagem da determinação de CIM em microplaca utilizando a resazurina como indicador de viabilidade celular, com *B. cereus* ATCC 14579 e os extratos de própolis: verde MEL do SOL, verde Apiário do Vovô MG, verde DF e verde Apiário do Vovô PR. Cor azul = morte celular e cor e rosa fluorescente = resazurina reduzida a resorufina pelas enzimas óxido-redutases presentes nas células vivas.