

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**

**Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de
própolis da região da foz do Rio São Francisco - Brasil**

YZILA LIZIANE FARIAS MAIA DE ARAUJO

**ARACAJU
JANEIRO – 2009**

**UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
VARIEDADES DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DA FOZ DO RIO
SÃO FRANCISCO - BRASIL**

Dissertação de mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

YZILA LIZIANE FARIAS MAIA DE ARAUJO

Orientadores:

Sara Cuadros Orellana, D.Sc.

Edilson Divino de Araújo, D.Sc.

**ARACAJU
JANEIRO – 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

A663e	<p>Araujo, Yzila Liziane Farias Maia de Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da Foz do Rio São Francisco - Brasil / Yzila Farias Maia de Araujo ; orientadores Sara Cuadros Orellana, Edilson Divino de Araujo . – Aracaju, 2009. xv, 104 p. : il. ; 30 cm</p> <p>Inclui bibliografia Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, 2009</p> <p>1. Própolis. 2. São Francisco, Rio (Brasil) – Região nordeste. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Avaliação química. 5. Saúde ambiente. 7. Fitoterapia. I. Orellana, Sara Cuadros. II. Araújo, Edilson Divino de. III. Titulo.</p>
-------	--

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE VARIEDADES DE PRÓPOLIS
DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO FRANCISCO - BRASIL**

YZILA LIZIANE FARIAS MAIA DE ARAUJO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE
DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE EM AMBIENTE.

Aprovada por:

Sara Cuadros Orellana, D.Sc.

Orientadora

Edilson Divino de Araújo, D.Sc.

Orientador

Maria José Fonseca, D.Sc.

1º. Examinador

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.

2º. Examinador

Juliana Cordeiro, D.Sc.

1º. Suplente

Rita de Cássia Trindade, D.Sc

2º. Suplente

Aracaju

Janeiro - 2009

Dedico esse trabalho:

Ao meu grande amigo e esposo Edílson por todo seu amor e confiança, sempre me dando todo apoio possível até mesmo nos momentos a distância... Obrigada por fazer parte de minha vida e estar comigo em mais uma conquista, faltam algumas e espero estar sempre com você para sorrirmos juntos! Amo-te meu lindo.

AGRADECIMENTOS

Ao maior amor da minha vida "DEUS", que nunca me abandonou e sei que nunca irá me abandonar te adoro SENHOR.

Ao meu amigo, companheiro e esposo Edílson. Agradeço a Deus por cada dia que passo com você, na alegria e na tristeza, na saúde e na doença e em todos os dias de nossas vidas... Eu te amo meu lindo menino. Obrigada por sua presença, por suas palavras de ânimo. Você é um grande exemplo para mim. Obrigada a Stela e à Maiara, dois presentes de Deus na minha vida, obrigada pela preocupação e apoio, amo vocês de todo o coração.

A Márcia, uma amiga que com todo carinho me ouviu nos momentos difíceis e cuidou com todo amor de minha casa e meus filhotes, valeu Marcinha pelo apoio.

Aos meus pais Reinaldo e Suely que sempre me apóiam e estão sempre torcendo por mim. Amo muito vocês. Às minhas irmãs Dayse, Carla e ao meu cunhado Raul, que mesmo estando separados pelo oceano Atlântico me transmitem segurança, confiança e paz, obrigada por vocês existirem em minha vida. Obrigada minhas amadas irmãs.

Às minhas tias, em especial tia Creuza e tia Marlene, obrigada pelo apoio nos momentos que precisei. À minha família goiana, meus sogros Miguel e Sebastiana, às minhas cunhadas Josefa, Marlene e Ana e aos meus cunhados Antônio e Odilon e a todos que sempre intercederam por mim, muito obrigada por todos vocês existirem em minha vida.

À minha grande amiga Lucyana Mendonça, cada momento que esteve comigo nos experimentos está registrado para sempre, você mora em meu coração e sabe que pode contar comigo sempre em sua vida, desejo sucesso a você e aos seus. Danielle Rodrigues obrigada pelos momentos que passamos juntas em Ribeirão Preto, obrigada por todo apoio também amiga. Aos colegas do Laboratório de Biologia Tropical e em especial a Adailton e Emilene, muito obrigada. À minha amiga M.Sc. Érika Caldas pelo ombro amigo.

À amiga M.Sc. Patrícia Oliveira Santos e à amiga Juliana da Universidade Federal de Sergipe, pelo enorme apoio concedido, a vocês de todo coração muito obrigada. Ao Laboratório de Microbiologia Aplicada/UFS em nome da Drª Rita de Cássia Trindade, pelo apoio e por ter cedido algumas cepas para esta pesquisa.

À Drª Sara Cuadros Orellana minha querida orientadora, que com toda a paciência me ensinou a crescer profissionalmente, você Sara é também um grande exemplo para mim, obrigada por cada SIM e por cada NÃO.

À Profª.Drª. Janice Druzian e aos colegas do LAPESCA por todo apoio, assim como à Profª. Drª. Maria José Fonseca e aos colegas do laboratório de Controle de Qualidade da USP-RP, muito obrigada a todos que estiveram comigo neste período com quem pude dividir estes momentos de crescimento de minha vida profissional.

À professora Waldete Rolim pela sua paciência e seus ensinamentos da língua inglesa, muito obrigada.

À Drª. Juliana Cordeiro Cardoso e Drª. Francine Ferreira Padilha obrigada por todo apoio e dedicação nas horas tão complicadas de minha caminhada no mestrado. A todos os professores que puderam transmitir com tanto zelo estes ensinamentos e aos colegas do mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes pelo apoio, em especial à colega Carol.

Ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa, com especial referência ao LEA - Laboratório de Estudos Ambientais, LEB - Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, LBT – Laboratório de Biologia Tropica, LPNS - Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos e LPA - Laboratório de Pesquisa em Alimentos, que deram apoio irrestrito ao desenvolvimento desse trabalho. À CAPES pela bolsa concedida durante parte do Curso, à FAPITEC pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa aprovado no edital FAPITEC Nº 03/2007 (Universal), que forneceu suporte parcial a esse trabalho e ao Programa PROCAD pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar experimentos na UFBA e na USP-RP.

Aos apicultores da região de Brejo Grande/SE, em especial a Gilvan e à Jucilene, que sempre que precisamos estiveram de braços abertos a nos receber e aos apicultores de Penedo/AL que gentilmente cederam as amostras de própolis para a realização deste trabalho.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma puderam colaborar com este fruto, muito obrigada a todos vocês.

SUMÁRIO

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE VARIEDADES DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO FRANCISCO - BRASIL.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS.....	4
Objetivo Geral	4
Objetivos Específicos	4
CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1.1. A Apicultura	6
1.2. Abelhas Melíferas.....	8
1.3. A Região do Baixo São Francisco	9
1.4. Antibióticos	10
1.5. Própolis.....	12
1.5.1. Métodos de Extração	14
1.5.2. Composição química	14
1.5.3. Atividade Antibacteriana.....	16
1.5.4. Atividade Antifúngica	17
1.5.5. Atividade Antioxidante	18
1.6. Panorama atual e Perspectivas futuras.....	19
1.7. REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROPOLIS VERMELHA DO ESTADO DE SERGIPE.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
2. INTRODUÇÃO	33
2.1. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1.1 Coleta do Material	35
2.1.2. Preparo do extrato bruto hidroalcoólico de própolis vermelha (EBHP)	35
2.1.2.1. Extração em banho-maria.....	35
2.1.2.2. Extração em Soxhlet.....	35
2.1.2.3. Maceração.....	36

2.1.2.4. Ultra-som	36
2.1.3. Obtenção do extrato seco de própolis.....	37
2.1.4. Linhagens utilizadas	37
2.1.5. Preparo dos Meios de cultura	38
2.1.6. Preparação e semeadura do inóculo.....	38
2.1.7. Atividade antimicrobiana	38
2.1.8. Análise Estatística	39
2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
2.2.1. Triagem, trituração e obtenção do extrato bruto hidroalcoólico de própolis (EBHP) e do resíduo seco	40
2.2.2. Avaliação da Atividade antimicrobiana	41
2.3. CONCLUSÕES	44
2.4. REFERÊNCIAS.....	45
CAPÍTULO III – ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO FRANCISCO	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
3. INTRODUÇÃO	51
3.1. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1.1. Coleta de Campo	54
3.1.2. Preparo do extrato bruto hidroalcoólico de própolis (EBHP)	55
3.1.3. Obtenção do extrato seco de própolis.....	55
3.1.4. Cepas utilizadas	56
3.1.5. Preparo dos Meios de cultura	59
3.1.6. Preparação e semeadura do inóculo.....	59
3.1.6.1. Atividade antimicrobiana	59
3.1.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	60
3.1.7. Análise do teor de flavonóides	61
3.1.8. Análise de Compostos Fenólicos Totais.....	61
3.1.9. Medida da atividade doadora de H ⁺ ao radical DPPH•.....	62
3.1.10. Análise Estatística.....	62
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.2.1. Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico de própolis (EBHP) e do resíduo seco.....	63
3.2.2. Determinação da atividade antimicrobiana	65
3.2.2.1. Screening da atividade antimicrobiana das 25 amostras de própolis coletadas na região da Foz do rio São Francisco.	65
3.2.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana das 10 amostras selecionadas de própolis.	68

3.2.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	71
3.2.2.5. Determinação do teor de Flavonóides, DPPH e de Compostos Fenólicos Totais	73
3.2.2.6. Relação entre a atividade antimicrobiana e o teor de flavonóides e de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis.....	75
3.3. CONCLUSÕES	78
3.4. REFERENCIAS.....	79
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL.	83

LISTA DE TABELAS

	Pg.
CAPÍTULO II	
Tabela 2.1 – Rendimento do resíduo seco dos EBHP em relação a cada tipo de extração realizada-----	41
Tabela 2.2 – Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólico de própolis vermelha, testados frente às bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> e frente à levedura <i>Candida guilliermondii</i> -----	41
CAPÍTULO III	
Tabela 3.1 – Banco de origem e principais características biológicas dos microrganismos usados no estudo -----	56
Tabela 3.2 – Atividade antimicrobiana dos vinte e cinco extratos de própolis frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Candida parapsilosis</i> -----	66
Tabela 3.3 – Atividade antimicrobiana dos 10 extratos de própolis frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Aspergillus nidulans</i> -----	70
Tabela 3.4 – Resultados das CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos 10 extratos de própolis pelo método de microdiluição em caldo -----	71
Tabela 3.5 – Resultados do teor de flavonóides (μg quercetina/g própolis), DPPH [*] e fenóis totais (mg fenol/g própolis) dos extratos de própolis vermelha ---	73
Tabela 3.6 – Resultados do teor de flavonóides (μg quercetina/g própolis) e fenóis totais (mg fenol equivalente a quercetina/ g própolis) para a bactéria Gram - negativa e os fungos -----	76
Tabela 3.7 – Resultados do teor de flavonóides (μg quercetina/g própolis) e Fenóis totais (mg fenol equivalente a quercetina/ g própolis) para a bactéria Gram – positiva -----	76
Tabela 3.8 – Teor mínimo de Flavonóides ($\mu\text{g/mL}$) necessário para a inibição microbiana, baseados nos resultados da CIM para os 10 extratos de própolis analisados -----	77

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
CAPÍTULO I	
Figura 1.1 - Divisão fisiográfica da bacia do rio São Francisco -----	09
CAPÍTULO II	
Figura 2.1 – Processo de coleta da própolis, obtenção do EBHP e extração da própolis vermelha a quente. A) Própolis vermelha (seta); B e C) coleta da amostra de própolis das frestas e tampa da caixa modelo Langstroth; D) EBHP e E) Extração a quente (extrator soxhlet) -----	36
Figura 2.2 – Fluxograma de obtenção do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha -----	37
Figura 2.3 – Procedimento de preparo dos poços -----	39
Figura 2.4 – Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis (soxhlet 2h e 4h, maceração 4h30min e banho-maria 2h) frente a <i>S. aureus</i> -----	42
Figura 2.5 – Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis (maceração 9h30min, ultra-som 1h e 2 h e banho-maria 4 h) frente a <i>S. aureus</i> -----	42
CAPÍTULO III	
Figura 3.1 - Fluxograma: etapas desenvolvidas no estudo das amostras de própolis coletadas na região da foz do rio São Francisco -----	54
Figura 3.2 – Localização geográfica dos 5 apiários amostrados na região da foz do rio São Francisco. Apiário Capivara (CP), Apiário Pau-da-Gamela (PG), Apiário Cajuípe (CJ), Apiário Fernandinho (FE) e Apiário Piaçabuçu/Penedo (PE) -----	55
Figura 3.3 – Esquema da técnica de microdiluição em caldo para determinação do MIC -----	61
Figura 3.4 – Extratos obtidos a partir do processo em ultra-som 1h. a) Amostras do apiário CJ; b) Amostras do apiário CP; c) Amostras do apiário FE; d) Amostras do apiário PG; e) Amostras do apiário PE -----	63
Figura 3.5 – Rendimento em extrato seco de própolis proveniente dos cinco apiários do BSF -----	64
Figura 3.6 – Atividade antimicrobiana de extrato da própolis do Apiário CJ frente a <i>Staphylococcus aureus</i> -----	65
Figura 3.7 – (1) amostras do apiário CJ; (2) amostras do apiário CP -----	68
Figura 3.8 – Atividade antimicrobiana do extrato da própolis frente a <i>S. epidermidis</i>. A) Amostras do apiário CJ e B) Amostras do apiário CP -----	68
Figura 3.9 – Atividade antimicrobiana do extrato da própolis dos apiários CP e CJ frente a <i>B. cereus</i> -----	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

- ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – *American Type Culture Collection*
BSF - Baixo São Francisco
CIM – Concentração Inibitória Mínima
DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EBHP – Extrato bruto hidroalcoólico de própolis
EEP – Extrato etanólico de própolis
FAPISE – Federação apícola do estado de Sergipe
FDA – *Food and Drug Administration*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial
ITP – Instituto de Tecnologia e Pesquisa
LBT – Laboratório de Biologia Tropical
LEA - Laboratório de Estudos Ambientais
LEB - Laboratório de Engenharia de Bioprocessos
LMA/UFBA - Laboratório de Microbiologia de Alimentos/Universidade Federal da Bahia
LMA/UFS – Laboratório de Microbiologia Aplicada/Universidade Federal de Sergipe
LPA - Laboratório de Pesquisa em Alimentos
LPNS - Laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos
MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
OMS - Organização Mundial de Saúde
OPS – Organização Pan-Americana de Saúde
TSA - Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
UNIT – Universidade Tiradentes

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE VARIEDADES DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO FRANCISCO - BRASIL

Yzila Liziane Farias Maia de Araújo

Para combater microrganismos resistentes no século XXI, os esforços de pesquisa têm se voltado na busca de novos fármacos, sendo os produtos naturais, uma alternativa viável e possivelmente sustentável, quando comparados aos sintéticos. A própolis por se tratar de um produto natural, tem sido bastante estudada e tem se mostrado promissora no tratamento de diversas doenças infecciosas. O objetivo deste trabalho foi analisar a atividade antimicrobiana e composição química de variedades de própolis encontradas na Região da Foz do rio São Francisco contra bactérias e fungos potencialmente patogênicos. Inicialmente foi realizado testes para adequação da metodologia de determinação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em agar e tipo de extração de própolis. Em seguida, 25 amostras de própolis foram coletadas na região da foz do rio São Francisco e os extratos hidroalcólicos 70% foram obtidos a partir de extração por ultra-som 1 hora e destas amostras foram selecionadas 10 que melhor apresentaram perfil antimicrobiano. Como resultado, verificou-se atividade antimicrobiana da própolis frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*; frente aos fungos *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* e *Aspergillus nidulans*. Foi observado um halo de inibição reduzido frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Dentre as 10 amostras selecionadas de própolis vermelha de Sergipe, 70% atendem o valor mínimo exigido pelo Ministério da Agricultura de 0,25% (m/m) para flavonóides, enquanto para compostos fenólicos todas as 10 amostras apresentaram valores superiores a 0,50% (m/m), variando entre 1,35% a 2,27%. Estas amostras demonstraram atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o radical DPPH[•]. Conclui-se que amostras de própolis de coloração vermelha encontrada na região litorânea do nordeste brasileiro possuem propriedades biológicas importantes e que podem ser usadas futuramente na produção de medicamentos para uso pela população, assim como os resultados apontam para a viabilidade de investimentos em produção de própolis vermelha nesta região.

Palavras-chave: Própolis, Nordeste, Baixo São Francisco, Atividade antimicrobiana, Avaliação química.

ABSTRACT

To combat resistant microorganisms in the XXI century, research efforts have focused on the search for new drugs, and natural products are regarded as a viable and possibly sustainable alternative when compared with synthetic ones. Propolis, as a natural product, has been widely studied and seems promising in the treatment of various infectious diseases. The objective of this study was to collect propolis varieties from the San Francisco River Estuary Region and determine their chemical composition and antimicrobial activity against potentially pathogenic bacteria and fungi. Preliminary experiments were conducted to select the methodology for propolis extraction and antimicrobial susceptibility testing. Twenty-five propolis samples from the San Francisco River Estuary Region were extracted with ultrasound for 1 hour, and shown to exhibit good antimicrobial activity against three Gram-positive bacteria, namely *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus cereus*; two yeast and one filamentous fungus, namely *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* and *Aspergillus nidulans*; but showed lower inhibitory activity against Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Based on their antimicrobial activity profile against three selected microorganisms, ten samples, all regarded as red propolis, were chosen for further chemical characterization. Seven out of ten samples selected from Sergipe red propolis meet the minimum flavonoid content required by the Brazilian Ministry of Agriculture, which is 0.25% (m/m). With regard to phenolic compounds, all samples had values greater than 0.50% (m/m), ranging from 1.35% to 2.27%. No relationship was observed between the antimicrobial activity against the above-mentioned strains and the amount of total flavonoids and phenols in these samples. The 10 selected samples showed antioxidant activity, as shown by their ability to reduce the DPPH• radical. We conclude that red propolis samples found in the Northeast Brazilian coastal region have important biological properties and can be used in future production of drugs for use in society, and the results indicate the economic feasibility of red propolis production in this region.

Keywords: propolis, Northeast Brazil, San Francisco Estuary, antimicrobial activity, chemical evaluation.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas no Brasil, a mortalidade causada por doenças infecciosas, cujo combate geralmente está associado ao uso de antibióticos, apresentou um declínio representativo, saindo de 35,9% em 1950 para 6% em 1989. No entanto, o uso indiscriminado dessas substâncias tem causado o surgimento de microrganismos resistentes. Conseqüentemente, a partir de 2002 tem sido verificado um aumento da mortalidade causada por microrganismos resistentes sendo registrado o índice de 8,5% de mortes em 2004. O combate a estas doenças geralmente está associado ao uso de antibióticos; por outro lado, o uso indiscriminado destes tem causado um aumento significativo de resistência a antimicrobianos. A procura por novos antibióticos tem sido uma forma alternativa de evitar o surgimento de resistência microbiana. Desta forma, a pesquisa tem sido fomentada para a descoberta de novos antibióticos.

A utilização de produtos naturais com atividade antimicrobiana tem se mostrado uma alternativa viável para o tratamento de diversas doenças infecciosas como, por exemplo, as infecções alimentares ou mesmo doenças orofaríngeas. Um dos produtos naturais mais utilizados para infecções é a própolis, que já é encontrada comercialmente em diversas formas como spray ou extratos etanólicos que ajudam nas infecções na orofaringe, ou ainda na forma de sabonetes, xampus, balas, dentre outros.

A própolis é produzida a partir de resinas encontradas em exsudatos, brotos ou cascas das plantas, que são coletadas pelas abelhas do gênero *Apis mellifera* e modificadas por sua saliva. Existe ainda a geoprópolis que é produzida por abelhas da família dos meliponíneos, que são espécies de abelhas com ferrão atrofiado. Estas abelhas costumam misturar o barro com a resina retirada do vegetal, gerando assim a geoprópolis.

Diversos autores descrevem atividades biológicas importantes da própolis como hipotensiva, antitumoral, antiulcerogênica, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatória, antiprotozoária, inseticida, antiviral, anti-HIV, anti-herpes, antiinfluenza e anti-hepatite. Sua composição está diretamente ligada à flora coletada pelas abelhas, podendo variar sua coloração de uma região para outra. A própolis é uma mistura bastante heterogênea, possuindo em sua composição cerca de 30% a 40% de cera, óleos voláteis e ácidos aromáticos (5 a 10%), resinas, bálsamo e o pólen, que, é uma rica fonte de elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco. Mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis.

O mecanismo de ação antibacteriana da própolis é complexo e reflete sua complexidade química. Os diversos compostos fenólicos presentes na própolis

provavelmente contribuem para a sua bioatividade frente a diversos patógenos e explicam, em parte, a sua grande variedade terapêutica.

A espécie ou mesmo a linhagem de abelha utilizada pode influenciar na qualidade da própolis. Fatores não-biológicos, como a técnica de extração, metodologia de condução de ensaios e época do ano em que foi produzida a própolis, também podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica.

Este trabalho cobre uma lacuna do conhecimento sobre as variedades de própolis produzidas na região da Foz do rio São Francisco, que compreende os municípios que margeiam o rio São Francisco nas proximidades da sua Foz no estado de Alagoas e Sergipe todos localizados nas proximidades desta região. No estado de Sergipe, até o momento são poucos os trabalhos de caracterização das variedades de própolis produzidas. Nesse sentido, a região da Foz do rio São Francisco apresenta-se como um local muito atraente para a realização desse estudo, pela presença de uma grande variedade de própolis, com especial referência a uma variedade vermelha, que em estudos realizados, tem se mostrado bastante promissora em suas atividades biológicas. Trabalhos realizados no estado de Sergipe já confirmam importantes atividades biológicas que esta variedade de própolis vermelha possui como: atividade antifúngica (BITTENCOURT, 2008), atividade antibacteriana (SIQUEIRA, 2008) e atividade de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos com uso de membranas biológicas de colágeno contendo própolis vermelha (BARRETO, 2008).

Desse modo, a própolis passou a ser um produto promissor entre aqueles que podem contribuir efetivamente para o desenvolvimento da região Nordeste. Apesar do grande potencial econômico associado à própolis vermelha, ainda não existe um sistema de produção implantado na região que permita atender a procura interna e internacional por esse produto. Há também um enorme potencial de geração de valor agregado, que pode ser conseguido com essa matéria prima por meio do desenvolvimento de processos industriais que viabilizem a extração de compostos bioativos e pela geração de produtos secundários que utilizem a própolis como matéria prima.

No entanto, as variedades de própolis nordestinas entre elas a própolis vermelha ocupam um lugar de destaque no mercado nacional e internacional. O preço do Kg/própolis vermelha chega a R\$ 550,00 (comunicação pessoal). No nordeste os arranjos produtivos locais – APL's ainda não se encontram estruturados de modo que possam consolidar em curto prazo o mercado de própolis nessa região, ainda que gradativamente as pesquisas tenham gerado indicadores que asseguram o potencial de comercialização da própolis dessa região.

Em se tratando de variedades de própolis que são endêmicas do Nordeste, é importante ressaltar que as condições logísticas que não podem ser equiparadas a outras localidades, uma vez que as variedades de própolis são formadas a partir de condições ambientais específicas que dificilmente poderiam ser copiadas em outras regiões. As perspectivas futuras relacionadas às variedades de própolis nordestinas dependem, portanto, unicamente dos investimentos em organização produtiva, comercialização pesquisa e desenvolvimento de tecnologias associadas.

Desta forma, os resultados dessas pesquisas agregam valor científico ao produto que, de forma direta, contribui em um aumento do valor comercial destes produtos apícolas além de trazer um retorno aos apicultores contribuindo para o desenvolvimento produtivo de própolis. As pesquisas indicam a qualidade da própolis, somando a esta variedade encontrada em Sergipe potencial biológico ainda não conhecido no mercado. É importante ressaltar também a existência de uma associação de apicultores já bem organizada para a produção de mel e pólen, e interessada em colaborar com o fornecimento de própolis para este trabalho, que conta também com o apoio de diversos apicultores da região. Somado à contribuição desta associação, existe um convênio entre a Federação Apícola do estado de Sergipe – FAPISE e o Instituto de Tecnologia e Pesquisa – ITP, que aportou todo o apoio necessário ao desenvolvimento do Projeto, uma vez que a produção de própolis para essa região é uma das demandas ainda não atendidas da FAPISE.

As informações produzidas por esta pesquisa poderão contribuir de forma direta como um *feedback* para estes apicultores, dando o retorno necessário para que eles possam avaliar melhor os investimentos, os melhores locais e modos de produção de própolis. Estudos com as variedades de própolis encontradas nesta área ainda são escassos na literatura científica, por isso surge à oportunidade deste trabalho em desenvolver atividades relacionadas com estas variedades, podendo assim, esta se tornar mais um produto natural conhecido pelas comunidades do estado de Sergipe.

Este trabalho teve por objetivo estudar variedades de própolis encontradas na região da foz do rio São Francisco e avaliar sua atividade antimicrobiana contra microrganismos potencialmente patogênicos, verificando o melhor método de extração da própolis e a possível relação entre coloração, teor de ácidos fenólicos e de flavonóides presentes nessas variedades, e seu potencial antimicrobiano frente aos microrganismos testados.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos hidroalcoólicos de diferentes variedades de própolis da região da foz do rio São Francisco e sua relação com a composição química das amostras.

Objetivos Específicos

- Avaliar, por meio de quatro métodos diferentes, a melhor técnica de extração da própolis visando ao uso dos extratos como agente antimicrobiano.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.
- Avaliar a atividade antifúngica dos extratos de própolis da região da Foz do rio São Francisco.
- Avaliar a atividade antioxidante de extratos de própolis selecionados.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de própolis que apresentarem melhor atividade antimicrobiana.
- Quantificar os teores de flavonóides e compostos fenólicos totais nos extratos de própolis.
- Analisar a existência da relação entre os teores de flavonóides e o perfil de atividade antimicrobiana.

Esse trabalho está dividido em quatro partes, sendo a primeira uma revisão da literatura para o embasamento teórico sobre os assuntos pertinentes a essa dissertação, dois capítulos estão organizados em forma de artigos conforme as normas do programa de pós-graduação em Saúde e Ambiente e a última trata das conclusões gerais.

CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A Apicultura

As abelhas existem há mais de 100 milhões de anos. Proctor *et al.* (1996) acreditam que o surgimento e a proliferação das abelhas na Terra tenham ocorrido paralelamente ao aparecimento das angiospermas.

A criação de abelhas melíferas, ou apicultura, é uma atividade muito antiga, já exercida desde a pré-história. No Brasil as abelhas foram introduzidas pelos jesuítas, no século XVIII, durante o estabelecimento das missões nos territórios que fazem fronteira com o Brasil e o Uruguai. Após a expulsão dos jesuítas da região, estas abelhas se disseminaram nas matas (KERR, 1957). Mais tarde, dois eventos históricos marcam fortemente a apicultura brasileira. Um deles se deu no ano de 1838 no Rio de Janeiro, quando o Padre Manoel Severiano trouxe da Europa as primeiras abelhas do gênero *Apis* com intenção de criá-las para a produção de cera utilizada na confecção de velas (KERR *et al.*, 2001). O outro foi na década de 1950, quando a apicultura brasileira obteve seu principal incremento genético, com a introdução de abelhas africanas no ano de 1956 pelo Dr. Warwick Kerr, no município de Rio Claro – SP para fins de pesquisa, que accidentalmente enxamearam e cruzaram com as subespécies européias já existentes no Brasil desde o século 19, resultando em um polihíbrido denominado atualmente de abelha africanizada (KERR, 1957; KERR, 1967; MICHENER, 1975).

A idéia do Dr. Kerr de introduzir espécies de abelhas africanas no Brasil surgiu com o objetivo de realizar melhoramento genético e em seguida distribuir para os apicultores no Brasil, uma vez que dados da literatura internacional demonstravam grande produção de mel apartir desta espécie (GONÇALVES, 1998).

Atualmente, a apicultura está disseminada por todo território brasileiro e, segundo Almeida (2006), continua crescendo no Brasil com a produção do mel, produto bastante consumido na área alimentícia, além de outros usos, como na área de cosméticos e produtos farmacológicos. No ano de 2005, foram exportadas em torno de 14,4 mil toneladas de mel, gerando uma receita de US\$ 18,9 milhões para o país. São Paulo (US\$ 7,72 milhões), Ceará (US\$ 3,4 milhões), Piauí (US\$ 3,05 milhões) e Santa Catarina (US\$ 2,93 milhões) foram os principais estados produtores (BRASIL, 2006). Além do mel, as abelhas produzem outros importantes produtos como geléia real, pólen e própolis. Segundo Gonçalves (2006), o Brasil é um grande exportador de mel orgânico e própolis. No ano de 2008, considerando o período de janeiro a setembro, a receita das exportações de mel atingiu US\$ 35,48 milhões, o que dá uma idéia do rápido crescimento do Setor. Quanto às ceras e própolis foram gerados US\$ 3,72 milhões no período de janeiro a setembro de 2008,

valendo ressaltar que apenas os estados de São Paulo e Minas Gerais atuam como exportadores desses produtos apícolas. Diferentemente do mel, onde os Estados Unidos e a Alemanha respondem por mais de 90% das exportações brasileiras, a própolis é exportada principalmente para o Japão, que no ano de 2008 (até o mês de outubro) recebeu 77% das exportações brasileiras de própolis. Enquanto o preço do quilo de mel para exportação variou entre US\$ 2,30 e US\$ 3,30 a própolis foi comercializada no ano de 2008 por um preço médio de US\$ 37,84 o quilo (CBA, 2008).

Apesar de toda a própolis vermelha ser produzida na região Nordeste, esta não aparece nas estatísticas brasileiras como exportadoras de própolis. Esse paradoxo reflete a carência de estratégias que viabilizem a comercialização desses produtos, que assegure a realização do potencial efetivo de participação dessa Região, nas receitas provenientes da exportação de própolis do País.

A apicultura no Brasil deixou de ser vista como uma atividade extrativista, onde o recurso é retirado da natureza apenas como fonte de subsistência ou lucro. Passou a ser vista, nos últimos anos, como uma atividade profissional e uma alternativa econômica e sustentável para a população rural de diversas regiões do Brasil, por ser rentável e menos danosa ao meio ambiente (SEBRAE, 2003).

Outro benefício oriundo do incremento da apicultura é o aumento da polinização, que contribui para a preservação de muitas espécies vegetais e para a recuperação de áreas devastadas. Klein *et al.* (2007) avaliaram a produção agrícola de 200 países quanto ao grau de dependência de suas culturas frente aos polinizadores animais, tendo verificado que das 115 principais culturas analisadas a produção de frutas, vegetais ou sementes de 87 das culturas alimentares mundiais é dependente desses polinizadores. Em associação com culturas agrícolas, que dependem diretamente do trabalho polinizador das abelhas, a apicultura pode gerar aumentos de ganhos de produtividade e de qualidade. As abelhas, principalmente a *Apis mellifera*, representam as principais polinizadoras das culturas agrícolas mais economicamente representativas do mundo (WATANABE, 1994) e as únicas polinizadoras de diversas culturas, como é o caso do *Eucaliptus* (PACHECO *et al.*, 1985), a Canola (C.C.C., 1999) e o Café no Panamá (ROUBIK, 2002). Os rendimentos de algumas frutas, nozes e sementes podem sofrer uma diminuição de mais de 90% sem estes polinizadores (SOUTHWICK e SOUTHWICK, 1992).

A Região Nordeste, que mantém a flora bastante diversificada e possui clima favorável à atividade das abelhas durante todo o ano, é muito propícia à execução desta atividade agropecuária (SEBRAE, 2003).

1.2. Abelhas Melíferas

Segundo Oliveira (2006) as abelhas são descendentes das vespas, que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores. Durante esse processo evolutivo, surgiram várias espécies de abelhas. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies, porém acredita-se que existam cerca de 40 mil espécies ainda não descobertas. Somente 2% das espécies de abelhas são sociais e produzem mel. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas, e caracterizam-se por viver em colônias em um sistema de casta, onde existe divisão de atividades bem definidas dentro da colmeia.

Gauld e Bolton (1996) sugerem que a origem da *Apis mellifera* tenha sido em regiões de clima tropical, como na África. A abelha no Brasil, denominada africanizada, é um híbrido das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana (*Apis mellifera scutellata*). Segundo Gonçalves (1998), a denominação “africanizada” deve-se à dominância das características das abelhas africanas sobre as européias. Menos agressiva que a africana, a abelha africanizada tem grande facilidade de enxamear, alta produtividade e tolerância a doenças (OLIVEIRA, 2006).

Características como adaptação a ambientes inóspitos, alta capacidade de defesa, e ciclo reprodutivo mais curto que as demais subespécies aqui existentes, são características das africanizadas que muito se assemelham às das abelhas africanas nativas, onde permitem as ambas uma rápida ampliação da biomassa e significativo aumento populacional (GONÇALVES, 1994).

De acordo com Rinderer (1988), as abelhas africanas possuem vantagens em relação à européia tanto na capacidade de sobreviver em ambientes tropicais e subtropicais como também o comportamento higiênico frente a microrganismos e parasitas. Outro fator importante que as africanas possuem em relação à européia é a coleta de alimentos, como o pólen e demais nutrientes, e a rápida conversão às crias (PAGE *et al.*, 2000).

Teixeira *et al.* (2005) discutiram que o espectro de vôo de uma abelha *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 4-5 km em torno da colmeia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para a própolis. Segundo Marcucci (1995), ainda não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta, podendo sugerir que esteja relacionada com a atividade

antimicrobiana da resina que as abelhas utilizam a própolis como um anti-séptico, revestindo toda a parte interna da colmeia.

Nas Américas, as abelhas africanizadas estão restritas as regiões de baixas altitudes e lugares de invernos amenos (KERR, 1989), sendo que no Brasil, estão bem adaptadas a áreas urbanas, bordas de florestas e formações vegetativas abertas, como regiões costeiras.

1.3. A Região do Baixo São Francisco

A região do Baixo São Francisco (BSF) estende-se entre os estados de Alagoas e Sergipe (Figura 1). Compreende o trecho que se estende do município Pão de Açúcar - AL até a Foz que, nesse caso, funciona como indicadora de mudanças introduzidas na bacia hidrográfica do rio São Francisco. Problemas vivenciados nesta região, pode-se dizer que foram herdados a partir de impactos antrópicos à montante e são provenientes das interferências humanas FONTES (2003).



Figura 1.1 - Divisão fisiográfica da bacia do rio São Francisco.

Fonte: Ministério do Meio Ambiente - MMA (2007).

Segundo Oliveira (2003), esta área foi bastante degradada após a criação das cascatas do sub-médio e baixo São Francisco. Área onde inicialmente havia criação de

gado que em seguida passou a ser usada por pequenos agricultores para a cultura do arroz e também da pesca, foi modificada ao longo do tempo, interrompendo assim sua economia local, obrigando os moradores ribeirinhos a migrarem de sua localidade ou mesmo de sua atividade de subsistência. Desta forma, a população desta localidade começa ir à busca de novas atividades que lhe tragam o sustento familiar.

Segundo Moreira (1996), a apicultura é considerada uma das grandes opções para a agricultura familiar por proporcionar o aumento de renda, através da oportunidade de aproveitamento da potencialidade natural de meio ambiente e de sua capacidade produtiva. Em 2004, surge o primeiro trabalho desenvolvido na região do BSF com a comunidade Brejão dos Negros/SE na área da apicultura, mas especificamente com o pólen apícola. Mais tarde, surge a oportunidade de novos trabalhos, por se esta uma região bastante propicia à produção de uma variedade de própolis de cor vermelha (ARAUJO, 2008). A produção de própolis é uma das mais rentáveis atividades ligadas à apicultura, além da produção do pólen e do mel. A própolis, produto de apiários comercializado em paralelo ao pólen, ao mel ou mesmo a geléia real, é um material resinoso de consistência viscosa elaborado pelas abelhas que coletam matéria-prima de diversas partes de plantas (BURDOCK, 1998).

1.4. Antibióticos

Os antibióticos são substâncias sintetizadas também apartir de microrganismos como os fungos e bactérias, podendo ser também produzidos de forma sintética em laboratório. Estes por sua vez, são usados nos tratamentos de doenças infecciosas e parasitárias e tem sido visto como um dos avanços na história da medicina (SIQUEIRA-BATISTA e GOMES, 2005).

Considerado como produto de grande importância para a saúde e economia, os antibióticos são produtos que possuem atividade antimicrobiana frente a diversos microrganismos que causam infecções. A cada ano, uma grande quantidade de novas substâncias são descobertas, porém, nem todas são aproveitadas como uso terapêutico. O índice de mortalidade no Brasil causado pelas doenças infecciosas teve pronunciada diminuição entre as décadas de 50 a 80, porém ocorreu um discreto aumento entre os anos de 2001 a 2004 (BRASIL, 2006).

Segundo dados da Organização Pan-Americana de Saúde – OPS (1990), mesmo apresentando na segunda metade da década de 80 uma evolução favorável, o Brasil ainda apresentava um coeficiente de mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias em torno de 33,0 por 100.000 habitantes, próximo das taxas encontrada na Colômbia e Suriname e

bem acima das verificadas em países como o Chile (19,2 por 100.000 habitantes), Costa Rica (11,8 por 100.000 habitantes) e Cuba (9,1 por 100.000 habitantes).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos está aumentando sua prevalência no mundo todo (ANDERSSON, 2003). Este aumento deve-se ao surgimento de novos mecanismos de resistência, a transferência epidêmica dos genes móveis entre as bactérias e a propagação das linhagens multirresistentes entre os pacientes (LIVERMORE, 1998; POOLE, 2004). O uso indiscriminado e equivocado de antibióticos facilita o surgimento de bactérias e outros microrganismos cada vez mais resistentes, reduzindo a eficácia dos medicamentos (NEU, 1992; SIQUEIRA-BATISTA e GOMES, 2005).

Segundo Webb *et al.* (2005), o uso inadequado dessas drogas pode causar consequências como o uso de antimicrobianos de maior custo e mais tóxico ou mesmo internações mais longas, o que pode dificultar e encarecer os tratamentos, podendo de certa forma impossibilitá-los, devido à resistência microbiana.

Segundo Newman *et al.* (2000; 2002), os produtos naturais tem sido fontes valiosas para o desenvolvimento de novas drogas, permitindo avanços em busca de novas drogas com atividade terapêutica. As vantagens dos produtos naturais em relação às drogas sintéticas foram revisadas por Clardy e Walsh (2004) em um artigo publicado na revista Nature. Entre as características diferenciais dos produtos naturais apontadas por estes autores estão sua alta complexidade e grande diversidade estrutural, além da capacidade de atuar de forma finamente ajustada aos mecanismos biológicos. Na natureza há um grande potencial e diversidade de ação terapêutica em produtos naturais que ainda precisa ser explorado. A busca por novos antibióticos tem sido uma alternativa como forma de mitigar o crescimento destes microrganismos resistentes. Desta forma, a pesquisa tem sido fomentada para a descoberta de novos antibióticos.

Pesquisadores têm demonstrado que em torno de 28% de drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e outras entidades equivalentes de outros países, são de origem totalmente natural e cerca de 40% são derivadas destes (NEWMAN *et al.*, 2002). A importância de drogas provenientes de produtos naturais tem demonstrado valor reconhecido, sendo que, o grande desafio agora é identificar novos compostos bioativos (ODONI, 2007) e caracterização de novos produtos.

Por apresentar inúmeras atividades biológicas, inclusive a antimicrobiana (BURDOCK, 1998), a própolis passa a ser um produto promissor na área da pesquisa com produtos naturais.

1.5. Própolis

A própolis, produto apícola, é bastante usada pela sociedade por ser uma resina natural extraída de vegetais e modificada pelas abelhas melíferas (VARGAS, 2004; MARCUCCI, 1996). O termo própolis é de origem grega, onde “*pro*” significa “em defesa de” e “*polis*” quer dizer “cidade” (BURDOCK, 1998), e explica-se pelo fato da própolis ser utilizada pelas abelhas para vedar frestas e proteger o ambiente interno da colmeia contra microrganismos e animais invasores (BANKOVA *et al.*, 2000).

Segundo Castaldo e Capasso (2002), os primeiros registros da utilização da própolis pelo homem remontam ao Egito e à Mesopotâmia. Desde o ano 1.700 a.C, a própolis já era conhecida e usada pelos sacerdotes no Egito para embalsamar cadáveres. Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Por ser um antibiótico natural, mais tarde, persas, romanos e incas também fizeram uso da própolis para tratar infecções (PEREIRA *et al.*, 2002). Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores (IOIRISH, 1982).

Ao final do século XIX, na África do Sul, a própolis foi amplamente utilizada por apresentar uma importante característica biológica que é a propriedade cicatrizante (MARCUCCI, 1996), sendo muito utilizada durante a segunda guerra mundial em várias clínicas soviéticas (IOIRISH, 1982). Segundo Pereira *et al.* (2002), a própolis foi usada no tratamento da tuberculose na antiga URSS, assim como na medicina veterinária, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite.

Registrada sob número 9009-62-5 na base de dados americana sobre substâncias químicas - *Chemical Abstracts Service* (CAS) -, a própolis tem sido bastante utilizada desde a década de 1980 como suplemento alimentar, preventivo de enfermidades (BANSKOTA *et al.*, 2001), assim como em aplicações tópicas (ARVOUET-GRAND *et al.*, 1993). A própolis pode ser encontrada para comercialização sob diversas formas farmacêuticas e cosméticas tais como, comprimidos, dentifrícios, goma de mascar, pós, loções, creme facial, tinturas e ungüentos (HAY e GREIG, 1990).

Até o ano de 2002 o número de patentes relacionados com própolis oriundos de 39 países dos cinco continentes era de 239 (PEREIRA *et al.*, 2002). Partindo de 2003 até inicio de 2008, pesquisa realizada no *European Patent Office* tomando-se *Worldwide* como base de dados existe cerca de mais de 500 pedidos de patentes relacionadas à própolis, demonstrando assim, um crescimento no interesse por este produto (LUSTOSA *et al.*, 2008). Atualmente existem depositados no INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial - cerca de 32 registros de patentes utilizando própolis (INPI, 2008). A patente PI0006272-3 relata sobre um meio de identificar os tipos de própolis obtidos no Brasil a partir de

marcadores químicos na substância - compostos detectados em laboratório que servem como "assinatura" de qual tipo está sendo analisado.

Existem no Brasil alguns tipos de própolis que têm sido estudados ao longo do tempo. Segundo Marcucci (1996), a própolis possui uma variação em sua cor a depender de sua procedência, origem botânica, podendo variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo de seu tipo e idade. O seu odor é bem característico, podendo variar entre amostras, sendo que, o ponto de fusão é variável entre 60 – 70º C podendo atingir em alguns casos, até 100º C. É uma substância rígida, mas quebradiça quando fria e que se torna dúctil e maleável quando aquecida (MARCUCCI, 1996).

No Brasil alguns tipos de própolis já foram caracterizados e classificados por região. Porém, através de técnicas cromatográficas em camada delgada (CCD), pesquisadores revelam que cada amostra de própolis, independente do local encontrado, possui um perfil químico diferenciado (PARK *et al.*, 2000).

Após o processamento e análise das amostras quanto à aparência e coloração dos extratos, Park *et al.* (2000) classificaram as própolis brasileiras em doze tipos, analisando suas características físico-químicas e propriedades biológicas de algumas amostras coletadas em diferentes regiões brasileiras. Foram encontrados cinco tipos de própolis na região sul (grupo 1, 2, 3, 4 e 5), seis grupos na região nordeste (grupo 6, 7, 8, 9, 10 e 11) e um grupo na região sudeste (grupo 12) (PARK *et al.*, 2000).

Segundo Dausch (2007), um novo tipo de própolis de coloração vermelha, de colmeias encontradas ao longo da praia e dos rios do nordeste do Brasil, foi classificado como própolis do grupo 13 de acordo com as características físico-químicas e biológicas diferenciais. A principal origem botânica desta própolis é a planta *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio, encontrada ao longo da praia e região do mangue do nordeste do Brasil (SILVA *et al.*, 2007). Trabalhos descrevendo o potencial biológico desta variedade de própolis de cor vermelha encontrada em Cuba e na Venezuela já existem desde a década de 90, onde demonstra ter ação antimicrobiana, cicatrizantes e antioxidantes, sendo identificados os seus antecessores botânicos como *Clusia nemorosa* e a *Clusia scrobiculata* (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

Diversas pesquisas são realizadas com a própolis por possuir um amplo espectro de ação farmacológica devido a sua variedade de componentes químicos. Essa diferenciação pode variar de acordo com região, uma vez que, em regiões tropicais sua atividade é maior que nas regiões temperadas devido à diversidade vegetal (BANKOVA, 2005).

1.5.1. Métodos de Extração

Como descrito anteriormente, a composição da própolis é variável qualitativa e quantitativamente dependendo da ecoflora de cada região. Além disso, fatores associados à técnica de extração, metodologia de condução de ensaios e época do ano em que foi produzida podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (BIANCHINI, 1998).

Existem outros aspectos que podem contribuir na variação química da própolis: o tipo e tempo de extração (quente, frio ou extração através de ondas eletromagnéticas) ou mesmo o tipo de solvente com a qual a própolis é extraída (PARK *et al.*, 1998). Diversos autores comprovam que ao se modificar o tipo de extração, tempo ou mesmo o solvente os componentes químicos da própolis variam também (TRUSHEVA *et al.*, 2007).

Silva *et al.* (2006), verificaram que houve variação na quantidade de flavonóides obtido por quatro diferentes métodos de extração de própolis, sendo os métodos de extração a frio mais eficientes que os métodos a quente. Extratos hidroalcoólicos nas concentrações de 10 a 20% de própolis verde obtidos a partir da extração em banho-maria a 70°C não apresentaram inibição frente a *Staphylococcus aureus*, enquanto extratos nas concentrações de 60 a 80% demonstraram inibição (PARK *et al.*, 1998). Funari e Ferro (2006) realizaram extração da própolis utilizando o aparelho soxhlet e encontrou valores de cera dentro dos parâmetros exigidos pelo Ministério da Agricultura. Segundo Trusheva *et al.* (2007), entre três métodos de extração testados para a própolis (ultra-som por 10 e 30 minutos, maceração por 72 horas e extração em microondas por 20 e 30 segundos) com diferentes volumes de etanol a 70%, verificou-se que a quantidade de solvente usado não influencia no rendimento do extrato, sendo que, os três métodos de extração diferem principalmente em relação ao total de porcentagem de fenóis extraídos. No caso da extração em ultra-som, o rendimento de constituintes biológicos ativos como fenólicos e flavonóides aumentou com o tempo de extração realizada (TRUSHEVA *et al.*, 2007).

Pereira *et al.* (2002), analisaram a relação existente entre as propriedades biológicas de própolis e sua composição química, e sugeriram que a ação antimicrobiana esteja intimamente relacionada com a concentração de flavonóides e ácido cafeico encontrados nas amostras de própolis brasileiras.

1.5.2. Composição química

A própolis apresenta características variadas, a depender das estações do ano e da sua origem botânica (SFORCIN *et al.*, 2001; BANKOVA *et al.*, 2000). De uma maneira geral,

a composição da própolis inclui 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de pólen, além de metabólitos secundários, flavonóides, ácidos fenólicos e minerais (MATSUNO, 1997; MIYATAKA *et al.*, 1998).

Ao saírem em busca da matéria-prima para a própolis, as operárias da espécie *Apis mellifera* têm uma grande variedade de vegetais à sua escolha, a depender da região. Estes vegetais podem conter substâncias sendo secretadas ativamente ou mesmo substâncias exsudadas de algumas partes destes vegetais, como folhas e brotos foliares, mucilagens, gomas, látex ou ainda da resina (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

A própolis quanto a sua composição química é composta geralmente de flavonóides (como a queracetina, galangina, kaempferol e pinocembrina), aldeídos e cetonas, ácidos aromáticos e ésteres, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em diferentes quantidades (MATSUDA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2005; HAYACIBARA *et al.*, 2005).

Uma menor variação da composição química da própolis é observada nas regiões temperadas do planeta, como por exemplo, na Europa, onde seus principais compostos bioativos são os flavonóides (flavonas, flavonós e flavanonas). Há também na constituição da própolis elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI, 1996). Segundo Lima (2006), dentre todos esses grupos de compostos, o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonóides. A eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas às propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (VOLPI & BERGONZINI, 2006).

Sabe-se que as propriedades biológicas da própolis estão diretamente relacionadas à composição química, sendo que esta pode variar de acordo com a época da colheita, a ecologia da flora, assim como a espécie da abelha (PARK *et al.*, 2002). Segundo TOMÁS-BARBERÁN (1993), no Brasil esta composição química pode ainda variar devido ao grau de africanização da *Apis mellifera*.

De acordo com Trusheva *et al.* (2006), as amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas. Os derivados mais encontrados nas própolis coletadas na região de São Paulo e Minas Gerais são os derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e também grande quantidade de flavonóides, muitos dos quais não estão presentes em própolis da Europa, América do Norte e Ásia (SIMÕES *et al.*, 2004). Já a própolis vermelha, uma nova variedade encontrada no Nordeste

brasileiro (DAUSCH, 2007), alguns constituintes diferem das demais própolis já citadas anteriormente, sugerindo-se assim uma possível atividade biológica ainda não vista em outras amostras de própolis (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A própolis possui diversas propriedades biológicas, dentre elas, destacam-se sua ação analgésica (PAULINO *et al.*, 2003), como preservador de produtos da carne (HAN e PARK, 1995), anti-radicais livres (CHOI *et al.*, 2006), antiparasitária (STARZYK *et al.*, 1997), inseticida (GAREDEW *et al.*, 2002), anti-tumoral (KIMOTO *et al.*, 1998; BANKOVA, 2005), anti-HIV (ITO *et al.*, 2001), anti-herpes (AMOROS *et al.*, 1992), anti-influenza (SCHEVCHENKO *et al.*, 1972), anti-hepática (SUGIMOTO *et al.*, 1999), detoxificadora (HAVSTEEEN, 2002), anti-ulcera péptica (ARIPOV *et al.*, 1968), hepatoprotetora (KOLANKAYA *et al.*, 2002), imuno-moduladora (IVANOVSKA *et al.*, 1995), regeneradora de tecidos biológicos (BARRETO, 2008), ação hormonal (SONG *et al.*, 2002), sendo que seus efeitos biológicos atuam em sinergismo com a quimioterapia.

Diversos autores têm estudado a própolis e demonstrado outras propriedades biológicas como, por exemplo, antimicrobiana, antifúngica e antiviral (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). Outros estudos ainda apontam sua atividade contra células cancerígenas e as atividades antiinflamatória, imunoestimulante e antioxidante e antibiótica (EL-KHATIB *et al.*, 2002; IVANOVSKA *et al.*, 1995; SFORCIN *et al.*, 2000; TATEFUJI *et al.*, 1996).

1.5.3. Atividade Antibacteriana

Tosi *et al.* (1996) relatam que a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis depende do solvente utilizado para prepará-la, sendo que, normalmente são usados os extratos etanólicos de própolis, mas a fração aquosa também tem uma alta atividade antimicrobiana.

A concentração de flavonóides nas amostras de própolis é o que confere à sua ação antimicrobiana (KOSALEC *et al.*, 2005). Estudos constataram resultados positivos na utilização da própolis em testes contra as seguintes bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*; na bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (OLIVEIRA *et al.*, 2006; PARKER e LUZ, 2007).

Diversas pesquisas revelam atividade da própolis frente a microrganismos patogênicos como *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* que são conhecidos como causadores freqüentes de infecções hospitalares (KROL *et al.*, 1993; UZEL *et al.*, 2005; PEPELJNJAK e KOSALEC, 2004). GRANGE E DAVEY (1990) demonstraram que o

extrato etanólico de própolis (60mg/mL) e seus constituintes são ativos contra várias bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.* e *Bacillus cereus* e parcialmente inibiram o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, não apresentando, porém, nenhum efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*.

Segundo Bastos *et al.* (2008), amostras de própolis vermelha e verde coletadas no estado da Bahia e de Minas Gerais, respectivamente, apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Paenibacillus larvae*, o agente etiológico da doença conhecida como loque americana ou “cria pútrida”, que acomete o estagio larval das abelhas *Apis mellifera*. Atividade antibacteriana também foi conferida aos extratos etanólicos da própolis vermelha (grupo 13), que inibiram *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, observando-se, porém, variação quanto ao potencial de inibição frente a *S. aureus*, o que sugeriu variação no teor de flavonóides presentes nas amostras (DAUSCH, 2007). Em um trabalho recente, Siqueira (2008) demonstrou ação da própolis vermelha do estado de Sergipe frente à *Enterococcus faecalis*.

1.5.4. Atividade Antifúngica

À própolis também são conferidas ações fungicidas e fungistáticas, sendo o efeito fungicida relacionado à ocorrência de pinocembrina na própolis (METZNER, SCHNEIDEWIND, FRIEDRICH, 1977). Fernandes Jr. *et al.* (1995) avaliaram a atividade antifúngica de extratos etanólicos de própolis contra várias leveduras, e entre as espécies testadas está a *Candida albicans* (CIM₉₀ de 3,8 mg/mL – 1,7 % v/v), *Candida tropicalis* (CIM₉₀ de 2,1 mg/mL – 0,9 % v/v) e *Candida parapsilosis* (CIM₉₀ de 10,9 mg/mL – 4,9 % v/v).

A própolis brasileira tem demonstrado ação frente a diferentes espécies de *Candida* (UZEL *et al.*, 2005). Ação contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foi verificada por Sforcin *et al.* (2001). Segundo Chee (2002), a atividade antifúngica de extratos de própolis foi testada *in vitro* em *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Foi observado que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha do litoral norte do estado de Sergipe inibiu *Candida albicans* ATCC – 10231 e apresentou ação fungicida em uma concentração de 347,7 µg/ml (BITTENCOURT, 2008). Hegazi *et al.* (2000) relataram a atividade de própolis contra *Candida albicans* obtendo uma CIM entre 1200 a 6400 µg/mL.

O *Trichophyton rubrum* é o dermatófito mais freqüente, sendo responsável por causar a maioria das infecções na pele. Amostras de própolis da Turquia demonstraram ação *in vitro* frente a 29 espécies de *Trichophyton sp.* (KOC *et al.*, 2005). Segundo Farnesi (2007), a linhagem do fungo *Trichophyton rubrum* mostrou-se sensível a alguns tipos de

própolis de meliponídeos e a própolis verde coletada de *Apis mellifera*, sendo que a própolis verde foi mais eficaz, porém nenhum destes extratos de própolis coletada em Minas apresentou ação contra *Aspergillus nidulans*. Segundo Siqueira *et al.* (2008), a atividade antifúngica do extrato alcoólico de própolis vermelha foi mais eficiente que o extrato alcoólico de própolis verde frente a *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes*, sendo que as amostras de *T. rubrum* demonstraram-se mais sensível para a atividade antifúngica dos extratos alcoólicos de própolis.

1.5.5. Atividade Antioxidante

Um agente antioxidante biológico é definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato” (HALLIWELL E GUTERIDGE, 1990; BENZIE, 1996). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas naturalmente no organismo por meio de processos metabólicos oxidativos e são produzidas também por fatores externos. Estas substâncias são de extrema importância para os seres vivos (RUSSO *et al.*, 2002). Ao serem produzidas EROs no organismo, uma variedade de antioxidantes endógenos como α-tocoferol, ácido ascórbico, superóxido dismutase (SOD), peroxidase dentre outros desempenham papel de inativação (HALLIWELL *et al.*, 1995; NAGAI *et al.*, 2001).

Diversos autores discutem sobre patologias associadas à liberação de EROs no organismo como diabetes, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), doença cardíaca coronária, inflamação, cataratas, rugas, fragilidade óssea, falha nos rins ou mesmo o câncer (BENZIE, 1996; RUSSO *et al.*, 2002; FULIANG *et al.*, 2005; OGETURK *et al.*, 2005). Segundo BERG (1999) a ingestão de antioxidantes a partir da dieta tem importante ação preventiva contra estas doenças.

Por apresentar atividade antioxidante a própolis tem se mostrado muito importante para as pesquisas de interesse médico-farmacêutico (FONTANA *et al.*, 2004). A ação antioxidante deve-se ao fato de que os flavonóides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (MARCUCCI, 1998). Segundo NAGAI *et al.*, (2003), os flavonóides afetam e inibem a atividade de enzimas envolvidas na conversão de ácidos graxos poliinsaturados de membrana para ativar mediadores como fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipooxigenase e tem uma potente ação no combate aos radicais livres.

A atividade antioxidante deve ser analisada por diferentes técnicas que envolvam diversos mecanismos. Alguns testes são usados para medir atividade seqüestradora de radicais como ânion superóxido, radical hidroxil, DPPH[•] (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil),

ou ainda testes como a oxidação de membranas biológicas, oxidação de mitocôndria de fígado de rato e o sistema de xantina-xantina oxidase são usados para medir atividade antioxidante de substâncias.

PASCUAL, GONZALEZ e TORRICELLA (1994) relataram que a propriedade antioxidante da própolis (0,6 µg/mL – 9,5 µg/mL) prolonga a vida de ratos machos e fêmeas e pode ser atribuída a sua atividade anti-radical livre. NAGAI *et al.* (2001) observaram a atividade antioxidante de amostras de mel, geléia real e própolis baseando-se no sistema de peroxidação lipídica. Segundo MORENO *et al.* (2000) evidenciaram que vários extratos etanólicos de própolis argentina (20 µg/mL de princípios solúveis) demonstraram atividade anti-radicais livres baseados na descoloração do radical DPPH•. Extrato fluido e seco de própolis verde de São Paulo reduziu a emissão da luz produzida pelo radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD, revelando valores de IC₅₀ de 4,1 µg/mL e 5,4 µg/mL respectivamente (FONSECA, 2007).

1.6. Panorama atual e Perspectivas futuras

Atualmente a população busca cada vez mais o uso de produtos naturais como fonte alternativa mais saudável para alimentação, prevenção e tratamento de doenças. Na antiguidade a própolis já era utilizada para embalsamar corpos (PEREIRA *et al.*, 2002), desde então, a própolis é um produto utilizado empiricamente pela sociedade e, gradativamente a ciência vem testando as atividades biológicas presentes nas diferentes variedades de própolis encontradas no mundo, tendo sido usada, com respaldo científico, em diversas enfermidades como diabetes, câncer, doenças do coração ou mesmo para prevenção de doenças inflamatórias (KADOTA *et al.*, 2002). Diversos são os produtos disponíveis atualmente no mercado que contem própolis em sua composição, tais como: cápsulas, cremes, pomadas, géis pós barba, protetores labiais, xampus, condicionadores, chás, balas, dentre outros (LUSTOSA *et al.*, 2008), sendo que boa parte dos produtos brasileiros possuem registro no Ministério da Agricultura, atendendo as normas exigidas na Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

A possível substituição de antibióticos sintéticos por naturais tem sido uma busca constante. Kilic *et al.*, (2005) afirmam que *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, foram sensíveis a extratos de própolis da Turquia e que o uso dessa variedade de própolis pode ser considerada no desenvolvimento de uma terapia alternativa contra infecções com este nível de resistência. Estudo com cepas *S. aureus* resistentes à benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina foram principalmente sensíveis à própolis, podendo ter havido sinergismo do efeito de própolis com o antibiótico.

Por demonstrar atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus* coagulase positiva, Machado *et al.*, (2008) sugerem o emprego do extrato de própolis na composição de medicamentos para o tratamento de otites caninas causadas por *S. aureus*.

De acordo com a Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos – CATEF (2005), os produtos que contêm própolis e que apresentem indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamentos específicos segundo a Resolução-RDC nº 132, de 29 de maio de 2003, D.O.U. de 02/10/2003, sendo classificados como Apiterápicos (Brasil, 2003). Nos países da Europa, com exceção do veneno de abelha e da cera de abelha, os quais não podem ser considerados alimentos ou suplementos alimentares, todos os outros produtos apícolas como o mel, pólen, geléia real, e a própolis podem ter uso legal sendo oficialmente registrados como alimentos, alimentos funcionais, suplementos alimentares ou produtos medicinais, sendo que neste último caso devem ser atendidas determinadas condições de processamento e qualidade (NAS, 2006).

Por possuir diversas e importantes propriedades biológicas, já citadas anteriormente, a própolis tem sido bastante estudada, sendo assim, o incremento de pesquisas com este produto tem despertado grande interesse de indústrias e pesquisadores estrangeiros que buscam inovação utilizando produtos naturais.

A própolis vermelha uma das diversas variedades de própolis endêmicas da região Nordeste do Brasil, tem demonstrado enorme potencial de uso como matéria prima para o desenvolvimento de diversos produtos, e o incremento das informações e do interesse econômico sobre essa variedade nasce do desenvolvimento das pesquisas científicas. Apesar disso, só recentemente os primeiros trabalhos científicos utilizando própolis vermelha foram realizadas em universidades da região Nordeste (DAUSCH, 2007; SIQUEIRA, 2008; BITTENCOURT, 2008; BARRETO, 2008). Além disso, no aspecto comercial, nenhum estado do Nordeste brasileiro é exportador de própolis (CBA, 2008).

O fortalecimento dos Arranjos Produtivos Locais (APL's) relacionados à apicultura na região Nordeste nos últimos anos tem mudado radicalmente o cenário da Apicultura na Região, especialmente nos estados do Ceará e Piauí, que já possuem, inclusive, participação efetiva na exportação de produtos apícolas, especialmente mel (SEBRAE, 2003).

1.7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, W.M. **Radiossensibilidade de Esporos de *Paenibacillus larvae subsp. Larvae* em mel.** Monografia (especialização em Irradiação de Alimentos) Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil, 2006.
- AMOROS, M., SAUVAGER, F., GIRRE, L. e CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 23, p. 231-240, 1992.
- ANDERSSON, D.I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6, p.452-456, 2003.
- ARAUJO, E.D. *Adequação tecnológica para a produção de pólen como instrumento de geração de renda familiar para apicultores de comunidades do Baixo São Francisco.* In: Relatório Final de projeto de Pesquisa. Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe - FAPITEC/SE, Aracaju, SE, 28p, 2008.
- ARIPOV, K.L.A., KAMILOV, I.K. e ALIEV, K.U. Effect of propolis on experimental stomach ulcers in rats. *Meditinskii zhurnal Uzbekistana*, 5, p. 50-52, 1968.
- ARVOUET-GRAND, A. LEJEUNE, B., BASTIDE, P., POURRAT, A., PRIVAT, A.M., LEGRET, P. Extrait de propolis: II. etude de la cicatrisation de plaies chez le lapin et chez le rat. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 48, p. 171-178, 1993.
- BANKOVA, Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, p.114-117, 2005.
- BANKOVA, S, CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, p.3-15. 2000.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological and research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15, p. 561-571, 2001.
- BARRETO, A.L.S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2008.
- BASTOS, E.M.A.F., Simone, M., Jorge, D.M., Soares, A.E.E., Spivak, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97, p. 273–281. 2008.
- BENZIE, I. F. F. E STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, p. 70-76, 1996.
- BERG, R. D., HAENEN, G. R. M. M., BERG, H. D. E BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66, p. 511-517, 1999.
- BIANCHINI, L. E BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Sci agric Piracicaba*, 55, p. 149-152, 1998.

BITTENCOURT, F.O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**, Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no SUS: fortalecendo a capacidade de resposta aos velhos e novos desafios/Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília Ministério da Saúde, 228p:il – Série B. textos básicos da saúde. 2006.

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, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa**. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1, Página 18.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, p. 347-363, 1998.

CANOLA COUNCIL OF CANADA, disponível em: <http://www.canola-council.org>, consultado em 12/01/2009.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, p.S1 – S6, 2002.

CATEF - Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos. Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis, disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>>, consultado em: 29/12/2008.

CBA – Confederação Brasileira de Apicultura, disponível em: <http://www.brasilapicola.com.br>, consultado em 03/12/2008.

CHEE, H.Y. In vitro evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Mycobiology*, 30, p. 93-95, 2002.

CHOI, Y.M., NOH, D.O., CHO, S.Y., SUH, H.J., KIM, K.M. e KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Food science and technology research*, 39, p. 756-761, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, p. 829-837, 2004.

DAUSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do brasil e suas características químicas e biológicas**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP/SP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

EL-KHATIB, A.S. AGHA, A. M., MAHRAN, L. G.; KHAYYAL, M. T. Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo. *Zeitschrift für Naturforschung*, 57c, p. 379-385, 2002.

FARNESI, A.P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microrganismos**. Dissertação de mestrado, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2007.

FERNANDES JR, A., SUGIZAKI, M. F., FOGO, M. L., FUNARI, S. R. C. e LOPES, C. A. M. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 1. p. 63-69, 1995.

FONTANA, J. D., ADELMANN, J., PASSOS, M., MARASCHIN, M., LACERDA, C. A. DE E LANÇAS, F. M. **Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity.** New Jersey: Human press, 2004. p. 203-218.

FONTES, L.C.S. (Coord.). Estudo do processo erosivo das margens do baixo São Francisco e seus efeitos na dinâmica de sedimentação do Rio [on-line]. 2003. disponível na internet via url: <http://www.ana.gobr/gefsf/arquivos/ResumoExecutivo1-Arquivo> capturado em 03 de janeiro de 2009.

FULIANG, H.U., HEPBURN, H.R., HONGZHUAN, X., MINLI, C., DAYA, S. e RADLOFF, S.E. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 51, p. 47-152, 2005.

FUNARI, C.S.; FERRO, O. Análise de própolis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(1), p171-178, 2006.

GAREDEW, A., SCHMOLZ, E., SCHRICKER, B. e LAMPRECHT, I. Microcalorimetric investigation of the action of propolis on Varroa destructor mites. *Thermochimica Acta*, 382, p. 211-220, 2002.

GAULD, I & BOLTON, B (Eds.) **The hymenoptera.** 2a ed. London: Oxford University Press, 1996.

GONÇALVES, L.S. 50 anos de abelhas africanizadas no Brasil. In: *anais do XVI Congresso de Apicultura*, CD ROM, Aracaju, SE, 2006.

GONÇALVES, L.S. A influência do comportamento das abelhas africanizadas na produção, capacidade de defesa e resistência à doenças. In: *Anais do I Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto*. p. 69-79, Ribeirão Preto, SP, 1994.

GONÇALVES, L.S. Principais impactos biológicos causados pela africanização das abelhas *Apis mellifera* e perspectivas da apicultura brasileira. In: *Anais do III Encontro Sobre Abelhas*. p. 31-36, Ribeirão Preto, SP, 1998.

GRANGE J.M, DAVEY, R.W. Antibacterial properties of própolis (bee glue). *J R Soc Med*, 83, p.159-160, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, New York: Pergamon Press, p. 1-104, 1990.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Cleveland, 35, n.1/2, p.7-20, 1995.

HAN, S.K. e PARK, H.K. A study on the preservation of meat products by natural propolis: effect of EEP on protein change of meat products. *Korean Journal of Animal Science*, 37, p.551-557, 1995.

HAVSTEN, B., H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96, p.67-202, 2002.

HAY K.D, GREIG D.E. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 70, p.584-586. 1990.

HAYACIBARA MF, KOO H, ROSALEN PL, DUARTE S, FRANCO EM, BROWEN WH, IKEGAKI M, CURY JA. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *J Ethnopharmacol* 101, p.110-115. 2005.

HEGAZI, A. G., HADY, F. K. A. E. e ALLAH, F. A. M. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift Fur Naturforschung*, 55C, p.70-75, 2000.

HU, F, HEPBURN H.R, LI Y, CHEN M, RADLOFF S.E, DAYA S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute infl ammatory animal models. *J Ethnopharmacol*, 100, p.276-283. 2005.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Disponível em: <http://pesquisa.inpi.gov.br/MarcaPatente/servlet/PatenteServletController?Action=nextPage&Page=2>, consultado em 01/09/2008.

IOIRISH, N. **As Abelhas: farmacêuticas com Asas**, Moscou: Mir,.1982.

IVANOVSKA, N.D., DIMOV, D., BANKOVA e POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 47, p. 145-147, 1995.

KADOTA S, BANSKOTA AH, NAGAOKA T, SUMIOKA LY, TEZUCA Y, AWALE S, MIDORIKAWA K, MATSUSHIGE K. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 80, p. 67-73. 2002.

KERR, W.E. Distribuição da abelha africanizada em seus limites ao sul. *Ciência e Cultura*, 34, p.499-502. 1989.

KERR, W.E. Multiple alleles and genetic load in bees. *J. Apic. Res.* 6, p.61-64. 1957.

KERR, W.E. The history of introduction of African bees to Brazil, South Afric. *Bee Journal*, 39, p.3-5. 1967.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; SILVA, A.C.; ASSIS, M.G.P. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia: Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias Estratégicas*, 12, p. 20-41, 2001.

KILIC, A.; BAYSALLAR, M.; BESIRBELLIOGLU, B.; SALIH, B.; SORKUN, K.; TANYUKSEL, M. In vitro antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. In: *Annals of microbiology*, 55, p.113-117, 2005.

KIMOTO, T., ARAI, S., KOHGUCHI, M., AGA, M., NOMURA, Y., MICALLEF, M.J., KURIMOTO, M. e MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer detection and prevention*, 22, p. 506-515. 1998.

KLEIN, A. M., VAISSIE`RE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C. TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc.* 274, p.303–313. 2007.

KOC, A. N., SILICI, S., AYANGIL, D., FERAHBAS, A., ANKAYA, S. C. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses*, 48, p.205–210. 2005.

KOLANKAYA, D., SELMANOGLU, G., SORKUN, K. e SALIH, B. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78, p. 213-217, 2002.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharma*, 55; p. 423-430; 2005.

KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., PIETZ, G. e CZUBA, Z. Synergistic effect of toxicity investigation of propolis on *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Thermochimica Acta*, 394, p. 239-245, 2002.

LIMA M.G. **A produção de própolis no Brasil.** São João da Boa Vista, SP: Editora e Gráfica, 2006.

LIVERMORE, D. Multiresistance and “superbugs”. *Communicable Disease And Public Health*, 1, 74-76, 1998.

LUSTOSA, S. R., GALINDO, A. B., NUNES, L. C. C., RANDAU, K. P., ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, p.447-454, Jul./Set. 2008.

MACHADO, G.; CARDOSO, R.L. ; MABONI, F; VARGAS, A.C. Atividade antimicrobiana do extrato de própolis frente a isolados de *Staphylococcus coagulase* positiva de otite canina. In: *Anais do Conbravet*, CD R0620-1, Gramado, RS, Outubro, 2008.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, p.26, p.83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G. E SALATINO, A. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis.** Mensagem doce, 46, p. 1998.

MATSUDA AH, MACHADO LB, MASTRO NL. Thermal analysis applied to irradiated propolis. *Radiat Phys Chem*, 63, p.353-355, 2002.

MATSUNO, T., CHEN, C., BASNET, P. A tumouricidal and antioxidant compound isolated from an aqueous extract of propolis. *Medical Science Research*, 25, p. 583-584, 1997.

METZNER, J., SCHNEIDEWIND, E. M. e FRIEDERICH, E. Effect of propolis and pinocembrin on fungi. *Pharmazie*, 32, p. 730-732, 1977.

MICHENER, C.D. **Bees of the world.** 3 ed. Baltimore & London: Johns Hopkins University Press, 2007.

MICHENER, C.D. The Brazilian bee problem. Annu. *Re Entomol.* 20, p.399-416. 1975.

MIYATAKA, H., NISHIKI, M., MATSUMOTO, H., FUJIMOTO, T., MATSUKA, M., ISOBE, A., SATOH, T. Evaluation of propolis. II. Effects of Brazilian and Chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and concanavalin A. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21, p.723-729, 1998.

MOREIRA, A. S. **Apicultura.** Coordenadoria de Assistência Técnica Integral, 67 p. (Documento Técnico, 202). 1996.

MORENO, M. I. N., ISLA, M. I., SAMPIETRO, A. R. E VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, p. 109-114, 2000.

NAGAI, T., INOUE, R., INOUE, H. E SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, 80, p. 29-33, 2003.

NAGAI, T., SAKAI, M., INOUE, R., INOUE, H. E SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75, p. 237-240, 2001.

NEU, H.C. The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*, 257, p.1064 – 1073, 1992.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E.A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. *Current Cancer Drug Targets*. 2, p. 279-308. 2002.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*, 17, p.215-234. 2000.

NIPPON APITHERAPY SOCIETY. Legal issues related to the medicinal use of propolis and other bee products in Europe, in contrast with other continents, including North and South America. In: *International Apitherapy Symposium*, Japan, June, 2006.

ODONI, T. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***, Dissertação de mestrado, Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

OGETURK, M., KUS, I., COLAKOGLU, N., ZARARSIZ, I., ILHAN, N. e SARSILMAZ, M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 97, p. 273-280, 2005.

OLIVEIRA, A.C.P.; SHINOBU CS, LONGHINI R, FRANCO SL, SVIDZINSKI TI. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem I Oswaldo Cruz*, 101, p. 493-497, 2006.

OLIVEIRA, A.M. (Coord.). Estudo hidrodinâmico-sedimentológico do baixo São Francisco, estuário e zona costeira adjacente AL/SE. [on-line] 2003. Disponível na internet via <http://wwwана.гобр/gefisf/> arquivos/ResumoExecutivo1-1A. Arquivo capturado em 03 de janeiro de 2009.

OLIVEIRA, M. **Desafios e oportunidades para o mel brasileiro**. In: Revista SEBRAE Agronegócios Nº 3. Brasília: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas – SEBRAE, maio de 2006.

OPS. **Health conditions in the Americas; environmental problems affecting health**. Washington, D.C: OPS, 1990.

PACHECO, I.A; KAGEYAMA, P.Y.; BERTI FILHO, E.; WIENDL, F.M. Efeito de colmeias de *Apis mellifera* L. em pomar de sementes de *Eucalyptus saligna* Smith. *IPEF*, n.29, p.11-17, abr.1985.

PACKER, J.F., LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn*, 17; p.102-107; 2007.

- PAGE, R. E. JR, FONDRK, M.K, HUNT, G.J.GUZMÁN-NOVOA, E., HUMPHRIES, M.A. Genetic dissection of honey bee (*Apis mellifera*) foraging behavior. *J.Hered.*, 91, p.474-479. 2000.
- PARK, Y.K, ALENCAR S.M, SCAMPARINE A.R.P, AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, 2, p.997-1003. 2002.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, 58, p.3-7, 2000.
- PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18,p.313-318, 1998.
- PASCUAL, C., GONZALEZ, R. E TORRICELLA, R. G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *Journal of Ethnopharmacology*, 41, p. 9-13, 1994.
- PAULINO, N., DANTAS, A.P., BANKOVA, , LONGHI, D.T., SCREMIN, A., DE CASTRO, S.L. e CALIXTO, J.B. Bulgarian propolis induces analgesic and antiinflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *Journal of pharmacological sciences*, 93, p. 307-313, 2003.
- PEPELJNJAK, S. e KOSALEC, I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* sp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 240, p. 111-116, 2004.
- PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quimica Nova*, 25, p. 321-326, 2002.
- POOLE, K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, p.12 – 26, 2004.
- PROCTOR, M., YEO, P., LACK, A. **The natural history of pollination**. London: Harper Collins Publishers. 1996.
- RINDERER, T.E. **Evolutionary aspects of the africanization of honey-bee populations in the Americas**, In: Africanized Honey Bees and Bee Mites (eds. Needhan G.R, Page, R.E, Delfinadao-Baker M, Bowman C.E), 13-28. *Ellis Horwood , Chichester*. 1988.
- ROCHA L, DOS SANTOS LR, ARcenio F, CARVALHO ES, LÚCIO EMRA, ARAÚJO GL, TEIXEIRA LA, SHARAPIN N. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Rev Bras Farmacogn*, 13, p.71-74. 2003.
- ROUBIK, D. W. The value of bees to the coffee harvest. *Nature*, 417, p.708, 2002.
- RUSSO, A., LONGO, R. E VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 73, p. S21-S29, 2002.
- SEBRAE. **Histórias de Sucesso: experiências empreendedoras**. (Org) Mara Regina Veit. Belo Horizonte: SEBRAE-MG. 2003.
- SFORCIN, J.M, FERNANDES J.R.A, LOPES, C.A.M., BANKOVA, , FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, 73, p.243-249, 2000.

SFORCIN, J.M., FERNANDES, A., JR., LOPES, C.A.M., FUNARI, S.R.C. e BANKOVA, Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 7, p. 139-144, 2001.

SILVA, B.B; ROSALEN, P.L; CURY, J.A; IKEGAKI, M; SOUZA, C; ESTEVES,A; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian própolis. *eCAM - Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5, p.313-316, 2007.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: *World Congress on Computers In Agriculture*, 4, Orlando-FL-USA, p.393-396, 2006.

SIMÕES LMC, GREGORIO LE, DA SILVA FILHO AA, DE SOUZA ML, AZZOLINI AECS, BASTOS JK, LUCISANO-VALIN YM. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol*, 94, p.59-65, 2004.

SIQUEIRA, A.B, GOMES, B.S, CAMBUIM I, MAIA, R, ABREU, S, SOUZA-MOTTA C.M, DE QUEIROZ, L.A, PORTO, A.L. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Lett Appl Microbiol*. Nov, 2008.

SIQUEIRA, A.L. **Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*** – Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil, 2008.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P. **Antimicrobiano: guia prático**. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Rubio, 2005.

SONG, Y.S., JIN, C.B., JUNG, K.J. e PARK, E.H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, p. 89-95, 2002.

SOUTHWICK, E. E. & SOUTHWICK JR, L. Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States. *J. Econ. Entomol.* 85, p.621–633. 1992.

STARZYK, J., SCHELLER, S., SZAFLARSKI, J., MOSKWA, M. e STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittel-Forschung*, 27, p.1198-1199, 1997.

SUGIMOTO, Y., TARUMI, T., KANEKO, Y., ISAYAMA, S., KAWAI, N., SUGIMOTO, H., YAMADA, H. e KAMEI, C. Effect of propolis extract on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 22, p.1237-1239, 1999.

TATEFUJI, T.; IZUMI, N., OHTA T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19, p.966-970, 1996.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.S.A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *eCAM*, 2, p.85-92, 2005.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; GARCIA-VIGUEIRA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, 34, p.191-196,1993.

TOSI, B., DONINI, A., ROMAGNOLI, C. e BRUNI, A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytotherapy research: PTR*, 1014, p.335-336, 1996.

TRUSHEVA B, POPOVA M, BANKOVA V, SIMOVA S, MARCUCCI MC, MIORIN PL, PASIN FR, TSVETKOVA I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. e *CAM* 3, p.249-254, 2006.

TRUSHEVA, B., TRUNKOVA, D.; BANKOVA, Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. [on line] . *Chemistry Central Journal*, 1:13 doi:10.1186/1752-153X-1-13. 2007.

UZEL, A., SORKUN, K., ÖNCAG, Ö., COGULU, D., GENÇAY, Ö. e SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160, p. 189-195, 2005.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, 34, p.159-163, 2004.

VOLPI N, BERGONZINI G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 42, p.354-361. 2006.

WATANABE, M. E. Pollination worries rise as honey bees decline. *Science*, 265, p.1170. 1994.

WEBB, G.F.; D'AGATA, E.M.C.; MAGAL, P.; RUAN, S. A model of antibiotic-resistant bacterial epidemics in hospitals. *PNAS*, 102, p.13343-13348, 2005.

**CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE
EXTRAÇÃO DE PROPOLIS VERMELHA DO ESTADO DE
SERGIPE**

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE PROPOLIS VERMELHA DO ESTADO DE SERGIPE

EVALUATION OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS OF RED PROPOLIS OF SERGIPE STATE

RESUMO

Própolis é uma resina natural extraída de vegetais e modificada pelas abelhas melíferas. O extrato de própolis pode ser obtido a partir de diversos métodos de extração (a frio, a quente ou através de ondas eletromagnéticas). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes métodos de extração da própolis vermelha existente na região do Baixo São Francisco - BSF, usando como parâmetro de análise a atividade antimicrobiana frente a três linhagens-padrão de microrganismos, sendo uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 700790), uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 12600) e uma levedura (*Candida guilliermondii* ATCC 6260). A coleta da amostra de própolis foi realizada no município de Brejo Grande/SE (S 10°28'25" e W 36°26'12") em Dezembro de 2007. Os extratos de própolis em etanol a 70% foram obtidos através das extrações banho-maria, Soxhlet, Maceração e Ultra-som, e deixados em capela de exaustão para evaporar todo o solvente para obtenção da massa seca. Todos os extratos foram ressuspensos numa concentração de 5% (50 mg/mL) em etanol 70%. Os resultados de concentração de massa seca demonstraram que o rendimento de todas as extrações com exceção do extrato obtido em ultra-som 1 hora, se apresentou acima do valor preconizado pelo Ministério da Agricultura que é de no mínimo 11% de extrato seco. A determinação da atividade antimicrobiana da própolis vermelha foi realizada em triplicata pela técnica de difusão em poços usando alíquotas de 15 µL. Os extratos de própolis vermelha apresentaram halos de inibição entre 16,4 a 21,4 mm contra *S. aureus*, 13,4 a 21,3 mm frente a *E. coli* e halos de inibição variando entre 10,0 a 13,0 mm frente a *C. guilliermondii*. Porém dentre os quatro métodos o que demonstrou ser mais eficiente com relação à atividade antimicrobiana para os três microrganismos testados foi o método de ultra-som 1 hora, por demonstrar ser um método mais rápido e que não utiliza temperatura, embora seja um método relativamente negligenciado na literatura científica sobre própolis. Conclui-se que o rendimento das oito extrações manteve-se na faixa de 9,42% (ultra-som por 1h) a 28,14% (banho-maria por 4h) e o método de extração em ultra-som por 1 h demonstrou maior potencial de inibição frente aos três microrganismos testados, sendo considerado o método mais vantajoso.

Palavras-chave: Métodos de extração, própolis vermelha, difusão.

ABSTRACT

Propolis is a natural resin extracted from plants and modified by honey bees. Propolis extracts can be obtained through different extraction methods (cold, hot or by electromagnetic waves). In this context, this study aimed at evaluating different methods of extraction of red propolis from the region of the Lower San Francisco River - BSF, using as analytical parameter the antimicrobial activity against three microbial type-strains, including a Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 700790), a Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 12600) and a yeast (*Candida guilliermondii* ATCC 6260). The collection of the sample of propolis was held in the city of Grand Brejo / SE (S 10° 28'25"W and 36° 26'12") in December 2007. Propolis extracts in 70% ethanol were obtained through extraction of water-bath, soxhlet, maceration and ultrasound and left in the fume hood to allow the evaporation of the solvent and obtain the dry mass. All extracts were dissolved to a concentration of 5% (50 mg/mL) in 70% ethanol. Our results show that the yield of all extractions except the extract obtained in ultrasound for 1 hour were higher than the minimum proposed by the Brazilian Ministry of Agriculture, which is 11% of dry extract. The determination of antimicrobial activity of red propolis was performed in triplicate by the technique of well-diffusion using 15 µL aliquots. Red propolis extracts promoted inhibition halos between 16.4 and 21.4 mm against *S. aureus*, between 13.4 and 21.3 mm against *E. coli* and between 10.0 and 13.0 mm against *C. guilliermondii*. However, among the four methods, the most efficient one with regard to antimicrobial activity against the three microorganisms tested was ultrasound for 1 hour, which was also the fastest and did not require heating. Paradoxically, this method has been relatively neglected in the scientific literature on propolis. It follows that the yield of the eight extractions remained in the range of 9.42% (ultrasound for 1h) to 28.14% (water bath for 4h) and the method of ultrasound extraction for 1 h showed higher inhibition potential against the three test organisms, and is thus considered the most advantageous.

Keywords: extraction methods, red propolis, diffusion

2. INTRODUÇÃO

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

Sabe-se que as própolis possuem propriedades antihipotensivas, antioxidantes, de reparo cicatricial, bem como antibacterianas, antivirais e antifúngicas (KUJUMGIEV *et al.*, 1999; SFORCIN *et al.*, 2000; MARCUCCI *et al.*, 2001; DAUSCH, 2007; SIQUEIRA, 2008; BARRETO, 2008; BITTENCOURT, 2008).

A própolis verde tem sido bastante estudada devido a suas propriedades biológicas e terapêuticas (ALENCAR *et al.*, 2007; TRUSHEVA *et al.*, 2006; AYRES, MARCUCCI e GIORGIO, 2007). Menos conhecida que a própolis verde, a própolis vermelha também tem despertado grande interesse, por ser uma variedade mais rara encontrada na região Nordeste do Brasil, principalmente nos estados de Alagoas e Sergipe. Recentes estudos relataram que esta variedade apresenta atividade antioxidant e antimicrobiana em testes preliminares *in vitro*, sugerindo que este produto é composto por bioativos com potencial farmacológico (DAUGSCH *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; AWALE *et al.*, 2008; SIQUEIRA, 2008; BITTENCOURT, 2008; BARRETO, 2008).

A composição das própolis varia principalmente devido às condições ambientais, características genéticas da abelha e localização (SFORCIN *et al.*, 2000; KUMAZAWA *et al.*, 2004). No Brasil, existem vários tipos de própolis já descritos na literatura, sendo esta variação decorrente da biodiversidade e das dimensões geográficas do país (PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002; SALATINO *et al.*, 2005). A espécie ou mesmo a linhagem de abelha utilizada podem influenciar a qualidade da própolis. Porém, fatores não-biológicos, como a técnica de extração, metodologia de condução de ensaios e época do ano em que foi produzida a própolis, também podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (PARK *et al.*, 1997; BANKOVA *et al.*, 2000; BIANCHINI, 1998).

O extrato de própolis pode ser obtido apartir de diversos métodos de extração (a frio ou a quente), podendo ser usada à extração simples ou maceração, onde a amostra é deixada em contato com o solvente a frio por um tempo determinado, com ou sem agitação, ou por uma extração exaustiva que utiliza um aparelho com solvente aquecido (soxhlet), ou

ainda a extração por ondas electromagnéticas. Funari e Ferro (2006) realizaram extração da própolis utilizando o aparelho soxhlet para determinação do teor de cera. Extratos etanólicos de própolis de 60 a 80%, obtidos através de extração em banho-maria 70°C, demonstraram atividade bacteriana frente a *S. aureus* (PARK *et al.*, 1998).

Segundo Trusheva *et al.* (2007), entre três métodos de extração testados para a própolis (ultra-som por 10 e 30 minutos, maceração por 72 horas e extração em microondas por 20 e 30 segundos) com diferentes volumes de etanol a 70%, verificou-se que a quantidade de solvente usado não influencia no rendimento do extrato, sendo que os três métodos de extração diferiram principalmente em relação ao total de porcentagem de fenóis extraídos, sendo que a extração em ultra-som por 30 minutos apresentou rendimento mais elevado de flavanonas e dihidroflavonóis. No caso da extração em ultra-som, o rendimento de constituintes biológicos ativos como fenólicos e flavonóides aumentou com o tempo de extração realizada (TRUSHEVA *et al.*, 2007). Estudo realizado por Silva *et al.* (2006), verificou que houve variação na quantidade de flavonóides obtido por quatro diferentes métodos de extração de própolis, sendo os métodos de extração a frio mais eficientes que os métodos a quente. Pereira *et al.* (2002), analisaram a relação existente entre as propriedades biológicas de própolis e sua composição química, e sugeriram que a ação antimicrobiana esteja intimamente relacionada com a concentração de flavonóides e ácido cafeico encontrados nas amostras de própolis brasileiras.

O Baixo São Francisco (BSF) é ainda bastante rico em diversidade biológica, uma região principalmente constituída por áreas de restingas e manguezais. São poucos os trabalhos descritos na literatura científica sobre própolis vermelha, e mais precisamente sobre as própolis desta localidade. Os métodos de extração comumente utilizados na literatura com amostras de própolis desta região são extrações em banho-maria por 30 minutos, maceração por 2 horas e maceração por 24 horas (MAIA-ARAUJO *et al.*, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2008; BITTENCOURT, 2008). Havia, então, a necessidade da escolha do método de extração mais adequado para obtenção de componentes da própolis vermelha com atividade antimicrobiana.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar diferentes métodos de extração para a variedade de própolis existente na região do BSF, usando como parâmetro de análise a atividade antimicrobiana.

2.1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Coleta do Material

A coleta da amostra de própolis foi realizada no município de Brejo Grande/SE (S 10°28'25" e W 36°26'12") em Dezembro de 2007. A própolis de coloração vermelha foi coletada da parte interna e das frestas da tampa da caixa racional (modelo Langstroth) (Figuras 3.1A, 3.1B e 3.1C) e levada ao Laboratório de Biologia Tropical do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (LBT/ITP), onde a amostra passou pelo processo de triagem sob estereomicroscópio para retirada de impurezas e posteriormente triturada utilizando graal e pistilo e em seguida acondicionada a -20°C.

2.1.2. Preparo do extrato bruto hidroalcoólico de própolis vermelha (EBHP)

Neste estudo foram realizados quatro diferentes métodos de extração para a amostra de própolis, sendo banho-maria por 2 e 4 horas e soxhlet por 2 e 4 horas no Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA), maceração por 4h30min e 9h30min e ultra-som por 1 e 2 horas. Em todas as extrações utilizou-se 1 g de própolis e 12,5 mL de etanol a 70% (Figura 1D).

Todos os EBHP obtidos ao final do processamento de cada extração foram filtrados, centrifugados numa rotação de 2.000 g por 15 minutos e armazenados a -20°C para a etapa posterior de obtenção do extrato seco.

2.1.2.1. Extração em banho-maria

A extração da própolis foi feita em banho-maria para cada tempo determinado (2 e 4 horas) numa temperatura de 70°C.

2.1.2.2. Extração em Soxhlet

A própolis vermelha foi pesada e colocada em sachê de papel filtro antes do processo de extração. Em seguida, foi levada ao aparelho de soxhlet onde foi banhada com etanol a 70% durante 2 e 4 horas, a uma temperatura de aproximadamente 30°C (Figura 1E).

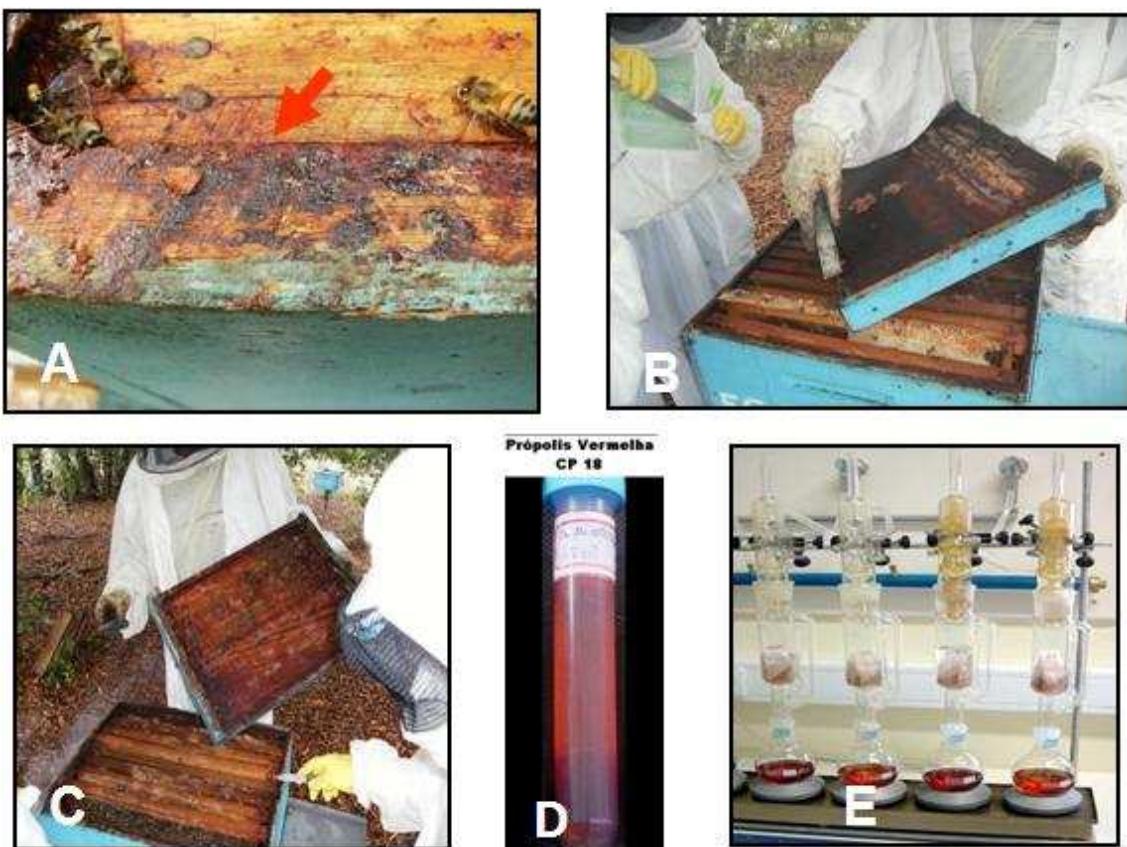


Figura 2.1 – Processo de coleta da própolis, obtenção do EBHP e extração da própolis vermelha a quente. A) Própolis vermelha (seta); B) e C) coleta da amostra de própolis das frestas e tampa da caixa modelo Langstroth; D) EBHP e E) Extração a quente (extrator soxhlet).

2.1.2.3. Maceração

Realizou-se uma extração a frio onde a amostra de própolis foi colocada em Becker com o solvente e deixada em temperatura ambiente, protegida da luz durante o tempo de extração (4h30 minutos e 9h30 minutos).

2.1.2.4. Ultra-som

A amostra de própolis foi colocada em tubo de ensaio estéril com 12,5 mL de etanol a 70% e em seguida levada ao aparelho de ultra-som para extração durante 1 ou 2 horas.

2.1.3. Obtenção do extrato seco de própolis

Os extratos obtidos dos quatro procedimentos foram deixados em capela de exaustão para que o solvente fosse totalmente eliminado, e em seguida deixado em dessecador com sílica para eliminação da umidade, sendo as placas monitoradas até peso constante. Após este processo, foi obtida a massa seca de cada extrato da própolis.

O rendimento dos processos de extração foi estimado com base na % da massa seca obtida em cada processo, a qual foi calculada tendo como referência a massa inicial da própolis antes da extração. Para o teste da atividade antimicrobiana os extratos secos obtidos foram ressuspensos numa concentração de 5% (50 mg/mL) em etanol a 70%. O Fluxograma ilustrado na figura 3.2 mostra as etapas de obtenção do EBHP.

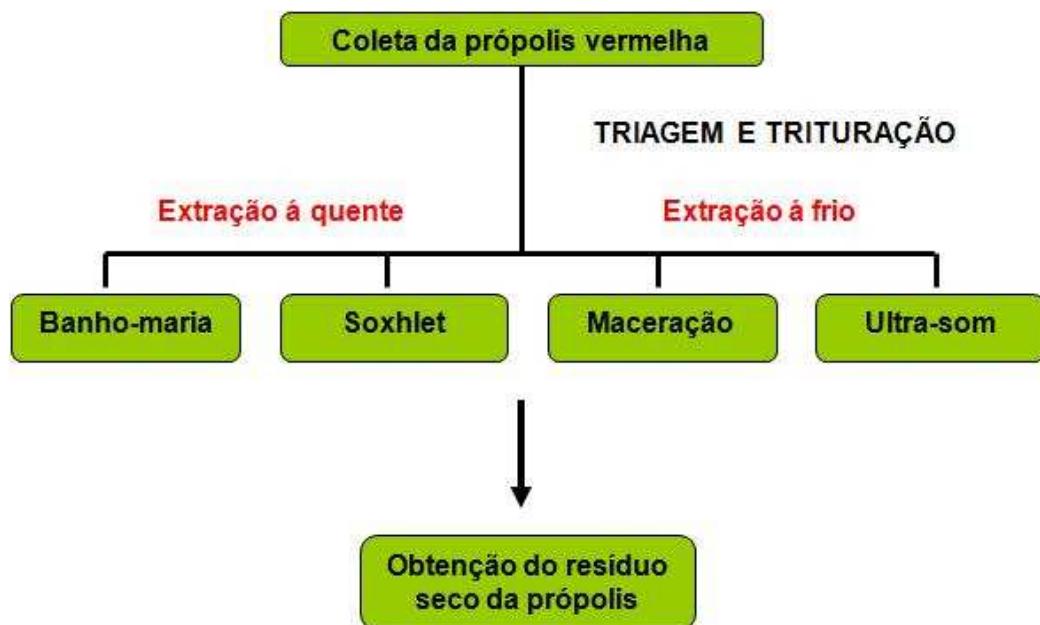


Figura 2.2 – Fluxograma de obtenção do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Sergipe.

2.1.4. Linhagens utilizadas

Foram utilizados três microrganismos de linhagens padrão, sendo uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 700790), uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 12600) e uma levedura (*Candida guilliermondii* ATCC 6260).

As cepas foram adquiridas da *American Type Culture Collection* e cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe (LMA/UFS).

2.1.5. Preparo dos Meios de cultura

O preparo dos meios foi conforme a Descrição de Meios de Cultura da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008). Foram usados dois tipos de meios de cultura; o Meio Ágar Müller Hinton para testes frente às bactérias Meio Sabouraud para os testes realizados com leveduras.

Os controles positivos usados para os testes foram os antimicrobianos comerciais de referência, cloranfenicol 5% para as bactérias e fluconazol 5% para a levedura, respeitado o perfil de sensibilidade de cada grupo e/ou individualidade dos microrganismos, e como controle negativo, o solvente utilizado na preparação do extrato, álcool a 70%.

2.1.6. Preparação e semeadura do inóculo

Os microrganismos foram semeados em meio de cultura de acordo com as exigências nutricionais de cada um, para obtenção de colônias revigoradas, com no máximo 24 horas de crescimento. Após o revigoramento uma alíquota de massa celular foi transferida, com o auxílio de alça de inoculação, para tubos contendo solução salina a 0,9%. A suspensão celular obtida foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland, que equivale a 10^8 células/mL.

A semeadura dos microrganismos nos meios de cultura para a realização dos testes se fez com o auxílio de *swabs* estéreis umedecidos com as suspensões celulares. Os inóculos foram então espalhados uniformemente sobre a superfície dos meio Agar Müller Hinton, para as bactérias e Agar Sabouraud, para a levedura. Após a secagem do inóculo foi então realizada a determinação da atividade antimicrobiana.

2.1.7. Atividade antimicrobiana

2.1.7.1. Difusão em agar pela técnica dos poços

A avaliação da atividade antibacteriana da própolis vermelha foi realizada pela técnica de poços descrita a seguir. Após a aplicação do inoculo, foram marcados poços eqüidistantes de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro em cada placa com pipeta de vidro Pasteur estéril, e com o auxilio de uma bomba de vácuo os poços foram succionados usando uma ponteira de polipropileno estéril cortada e acoplada à extremidade de uma mangueira. Todo o procedimento foi realizado em uma capela de fluxo laminar (Figura 3.3).



Figura 2.3 – Procedimento de preparo dos poços.

Alíquotas de 15 µL (750 µg) de cada extrato foram aplicadas nos poços e em seguida as placas foram incubadas nas condições ideais para cada microrganismo testado, sendo 24 horas a 36°C para as bactérias, e 48 horas a 35 °C para a levedura.

O teste de sensibilidade antimicrobiana foi realizado em triplicata e os resultados foram observados pela formação de halos de inibição, sendo tomadas as medidas com auxilio de um paquímetro digital.

2.1.8. Análise Estatística

A comparação das médias dos halos de inibição de extrato de própolis das quatro técnicas de extração foi realizada com auxílio do programa *Assistat 7.5 beta*. Aplicou-se análise de variância (ANOVA), sendo que a existência de diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey. Diferenças entre as médias ao nível de 1% ($p<0,01$) foram consideradas significativas (ZAR, 1999).

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1. Triagem, Trituração e obtenção do extrato bruto hidroalcoólico de própolis (EBHP) e do resíduo seco

Durante o procedimento de triagem e trituração da amostra de própolis coletada, foi observado que esta apresentava-se como uma resina rígida de coloração vermelha e quebradiça quando fria, em temperatura ambiente demonstrava um aspecto gomoso e quando aquecida durante as extrações sua forma modificava tornando-se mais maleável, o que está de acordo com o trabalho realizado por MARCUCCI (1996).

Para a obtenção dos EBHP foram empregados quatro tipos de extração em diferentes tempos a fim de avaliar o melhor método de extração para as amostras de própolis vermelha coletadas no estado de Sergipe. Em todas as quatro técnicas de extração testadas - banho-maria (2 e 4 horas), soxhlet (2 e 4 horas), maceração (4h30min e 9h30min) e ultra-som (1 e 2 horas), os extratos apresentaram uma coloração vermelha média a uma coloração vermelha mais escura, a depender do tipo e tempo de extração.

Em todas as extrações realizadas, o rendimento se apresentou acima do valor preconizado pelo Ministério da Agricultura que é de no mínimo 11% de extrato seco (BRASIL, 2001), com exceção do extrato obtido em ultra-som por 1 hora, o qual apresentou valor abaixo do valor exigido. O rendimento do resíduo de cada extrato da própolis está descrito na Tabela 3.1.

Quanto à temperatura usada nas extrações, pode-se observar na Tabela 3.1 que os extratos obtidos a quente demonstraram maior rendimento em relação àqueles obtidos a frio. Apesar disso, é válido lembrar que o rendimento não indica a qualidade do extrato da própolis, podendo uma amostra demonstrar rendimento mínimo e possuir propriedades biológicas efetivas.

Em relação ao tempo de extração, o maior rendimento obtido foi três vezes superior ao menor rendimento de resíduo seco da própolis, tendo variado entre 9,42% (ultra-som por 1 hora) e 28,14% (banho-maria por 4 h). No caso da extração em ultra-som, Trusheva *et al.* (2007) afirmam que o rendimento de constituintes biológicos ativos como fenólicos e flavonóides aumenta com o tempo de extração realizada, porém, acredita-se que uma extração por 30 min seja suficiente para extrair uma quantidade disponível de ácidos fenólicos e flavonóides.

Tabela 2.1 – Rendimento do resíduo seco dos EBHP em relação a cada tipo de extração realizada.

Tipo de Extração	Rendimento (% m/m)
Banho-maria por 2 h	25,58%
Banho-maria por 4 h	28,14%
Soxhlet por 2 h	24,29%
Soxhlet por 4 h	21,30%
Maceração por 4 h30min	16,27%
Maceração por 9h30min	11,73%
Ultra-som por 1 h	9,42%
Ultra-som por 2 h	20,99%

2.2.2. Avaliação da Atividade antimicrobiana

A amostra de própolis vermelha coletada apresentou halos de inibição com tamanho entre 16,4 a 21,4 mm contra *S. aureus*, halos entre 13,4 a 21,3 mm frente a *E. coli* e frente a *C. guilliermondii* halos de inibição variando entre 10,0 a 13,0 mm (Tabela 3.2).

Tabela 2.2 – Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólico de própolis vermelha, testados frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e frente à levedura *Candida guilliermondii*.

Método de extração	Diâmetro dos halos (mm)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. guilliermondii</i>
Banho-maria 2 h	17,7 ± 0,57 ^{cde}	17,7 ± 1,52 ^{bcd}	10,7 ± 0,57 ^d
Banho-maria 4 h	20,0 ± 0,00 ^{bc}	16,7 ± 2,08 ^{cde}	13,0 ± 1,00 ^b
Soxhlet 2 h	16,4 ± 1,15 ^e	13,4 ± 2,08 ^e	10,4 ± 0,57 ^d
Soxhlet 4 h	17,0 ± 1,00 ^e	15,0 ± 0,00 ^{de}	10,0 ± 0,00 ^d
Maceração 4h30min	17,4 ± 1,15 ^{de}	19,7 ± 0,57 ^{abc}	11,0 ± 0,00 ^{cd}
Maceração 9h30min	21,4 ± 1,15 ^{ab}	21,3 ± 2,08 ^{ab}	12,7 ± 0,57 ^{bc}
Ultra-som 1 h	20,4 ± 0,57 ^b	19,0 ± 1,00 ^{abc}	12,7 ± 1,15 ^{bc}
Ultra-som 2 h	19,7 ± 0,57 ^{bcd}	19,3 ± 0,57 ^{abc}	12,7 ± 1,15 ^{bc}
** CTL (+)	23,7 ± 1,15 ^a	22,0 ± 0,00 ^a	28,0 ± 0,00 ^a
*** CTL (-)	0,00 ± 0,00 ^f	0,00± 0,00 ^f	0,00 ± 0,00 ^e

Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente iguais para o teste de Tukey ($p<0,01$)

** CTL (+) – Controle positivo; *** CTL (-) – Controle negativo

Os controles positivos neste estudo foram utilizados principalmente como parâmetro de comparação do poder antimicrobiano dos extratos do que como padrão de validação de atividade antimicrobiana. Entretanto, comparando o controle positivo com o extrato obtido por maceração da própolis durante 9 h 30 min frente a *S. aureus*, observa-se que estes são estatisticamente iguais. O método de maceração por 9 h 30 min é também considerado estatisticamente semelhante aos métodos de banho-maria por 4h, ultra-som por 1 h e ultra-som por 2 h quando testados para *S. aureus* (Figura 3.4 e 3.5).

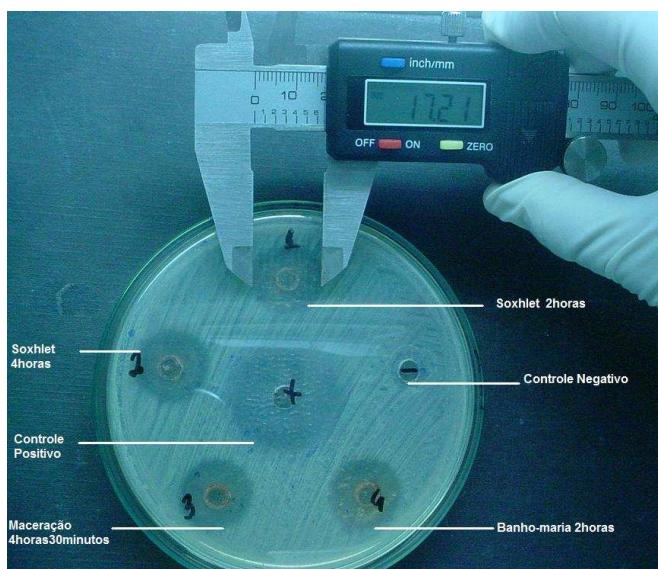


Figura 2.4 – Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis (soxhlet 2h e 4h, maceração 4h30min e banho-maria 2h) frente a *S. aureus*.

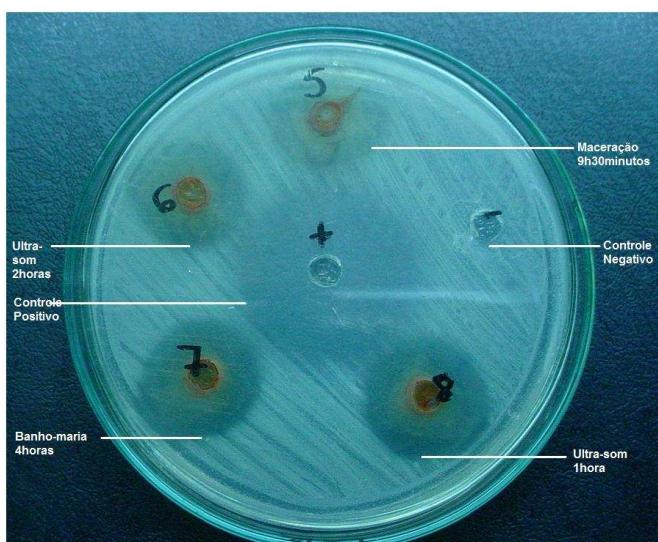


Figura 2.5 – Atividade antimicrobiana dos extratos de própolis (maceração 9h30min, ultra-som 1h e 2 h e banho-maria 4 h) frente a *S. aureus*.

Segundo GRANGE; DAVEY (1990); BANKOVA *et al.* (1999) e KUJUMGIEV *et al.* (1999), a própolis apresenta eficiente atividade frente a bactérias Gram-positivas e atividade reduzida frente a bactérias Gram-negativas. Ação confirmada de acordo com a metodologia em questão, pois obtivemos presença de halo de inibição maior para a cepa de *S. aureus* (bactéria Gram-positiva) e inibição menor para a cepa de *E. coli* (bactéria Gram-negativa). Os métodos de maceração por 4 h 30 min, maceração por 9 h 30 min, ultra-som por 1 h e ultra-som por 2 h demonstraram ser mais efetivos frente a *E. coli* além de serem estatisticamente iguais, podendo ser usado qualquer um desses métodos para obter resultados semelhantes quando testados com esta amostra de própolis para esta cepa bacteriana.

Dentre todas as extrações realizadas frente à levedura *Candida guilliermondii*, as que melhores apresentaram resultados foram banho-maria por 4 h, maceração por 9h30min, ultra-som por 1 h e 2 h, resultado semelhante obtido neste estudo frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

Sawaya *et al.* (2002) discutem que teste realizado com extrato de própolis proveniente do estado de São Paulo frente a cepas de diferentes espécies de *Candida*, dentre elas *C. guilliermondii*, demonstraram atividade antifúngica com halo de inibição de 8 mm através do método de difusão em agar (técnica do poço). O extrato seco de própolis foi ressuspensido na concentração de 10% (m/v) em etanol a 70% e em cada cilindro estéril foi pipetado o volume de 100 µL (10.000 µg) e 200 µL (20.000 µg), não havendo diferença de resultado em relação aos valores usados no poço (SAWAYA *et al.*, 2002). Neste estudo, o extrato de própolis vermelha do estado de Sergipe demonstrou ação antifúngica frente a *C. guilliermondii*, promovendo um halo de inibição de 10 a 13 mm na dose de 750 µg, demonstrando ser mais efetivo que o extrato descrito por SAWAYA *et al.* (2002).

Porém, dentre estes quatro métodos que demonstraram ser mais eficientes tanto para a bactéria *S. aureus* como os métodos testados para a bactéria *E. coli* e para a levedura *C. guilliermondii*, o método de ultra-som 1 h foi comum para a ação frente às três cepas, demonstrando ser o mais vantajoso por ser um método mais rápido para extração da própolis, e que não utiliza temperatura, embora seja um método pouco descrito na literatura científica.

Silva *et al.* (2006) demonstraram que houve variação na quantidade de flavonóides obtidos por quatro diferentes métodos de extração de própolis, sendo os métodos de extração a frio mais eficientes que os métodos a quente. Pereira *et al.* (2002), discutiram sobre a ação antimicrobiana está intimamente relacionado à concentração de flavonóides e ácido cafeico encontrados nas amostras de própolis brasileiras.

O estudo de extratos naturais tem sido visto como uma alternativa para a solução de problemas na área da saúde, como a resistência microbiana. Além disto, existe uma crescente preocupação dos consumidores no uso de produtos menos agressivos ao organismo e que incluem ingredientes naturais e não sintéticos (PACKER e LUZ, 2006). Sendo assim, extratos naturais como a própolis, e que possuam ação antioxidante, antibacteriana ou antifúngica, e que sejam obtidos a partir de métodos mais rápidos e eficientes, são mais interessantes que métodos que requeiram entre duas a nove vezes mais tempo e apresentem o mesmo resultado.

2.3. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- 1) O rendimento obtido a partir das oito extrações realizadas com a própolis manteve-se na faixa de 9,42% (ultra-som por 1h) a 28,14% (banho-maria por 4h), demonstrando ser compatíveis com os parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Agricultura que exige no mínimo 11%, sendo que apenas a extração em ultra-som por 1 h não atendeu a este requisito.
- 2) Mesmo apresentando rendimento abaixo do que o Ministério da Agricultura preconiza, o método de extração em ultra-som por 1 h demonstrou inibição potencial frente aos três microrganismos testados.
- 3) Os extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha do estado de Sergipe apresentaram atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Escherichia coli* ATCC 700790, apresentando halos de inibição de 16,4 a 21,4 mm e de 13,4 a 21,3 mm, respectivamente. Apresentaram ação antifúngica frente à levedura *Candida guilliermondii* ATCC 6260, com halos de inibição de 10 a 13 mm, variando de acordo com o método de extração.
- 4) Dentre os métodos de extração testados frente a *S. aureus*, *E. coli* e frente à levedura *Candida guilliermondii*, o método de ultra-som por 1 h foi o mais vantajoso em relação ao tempo de extração e à atividade antimicrobiana apresentada para estes três microrganismos.

2.4. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S.M.; OLDRONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKID, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), p.278-283, 2007.
- AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, p.181–189; 2008.
- AYRES, D.C.; MARCUCCI, M.C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on Leishmania amazonensis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(2), p. 215-220, 2007.
- BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S, MARCUCCI MC, TSVETKOVA I, KUJUMGIEV A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* 70: 190-193, 1999.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.D. e MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, p.3-15, 2000.
- BARRETO, A.L.S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** Dissertação de mestrado, UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2008.
- BIANCHINI, L. e BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do Própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia agrícola*, 55(1), p. 1-6, 1998.
- BITTENCOURT, F.O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha.** Dissertação de mestrado, UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2008.
- DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas Características químicas e biológicas.** Tese de doutorado, Campinas, SP, Brasil, 2007.
- DAUGSCH, A; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM* , 5(4), p.435-441,2007.
- GRANGE J.M, DAVEY, R.W. Antibacterial properties of própolis (bee glue). *J R Soc Med*, 83, p.159-160, 1990.
- KUJUMGIEV A, TSVETKOVA I, SERKEDJIEVA Y, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 64(3), p.235-240, 1999.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), p.329-339; 2004.
- MAIA-ARAUJO, Y.L.F., ARAUJO, E.D; ORELLANA, S.C. Avaliação da atividade antimicrobiana de uma variedade de própolis vermelha do estado de Sergipe. In: *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Apicultura*, Aracaju,SE, CD-ROM, 2006.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; VIGUERA, G.C.; BANKOVA, S.; CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian

propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 74, p. 105-112, 2001.

MENDONÇA, L.S; MAIA-ARAUJO, Y.L.F, ORELLANA, S.C, ARAUJO, E.D, CARDOSO, J.C, PADILHA, F.F. Estudo da atividade antimicrobiana de frações de própolis vermelha. In: *Anais do II WIMA – Workshop Internacional de Microbiologia Ambiental*, Aracaju/SE, CD-ROM, 2008.

PACKER, J.F., LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn*, 17, p.102-107; 2007.

PARK, Y. K., KOO, M. H., IKEGAKI, M. E CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de biologia e tecnologia*, 40, p.97-106, 1997.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*, 50, p.2502–2506, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18(3), p.313-318, 1998.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S; NETO, F.R.A. PRÓPOLIS: 100 Anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25(2), p321-326, 2002.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRIL, G.; MESSAGE, D. **Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis**. 2º ed, Cambridge: Oxford University Press, p. 33–38; 2005.

SAWAYA, A.C.H.F., PALMA, A.M., CAETANO, F.M., MARCUCCI ,M.C., SILVA CUNHA, I.B., ARAUJO, C.E.P. AND SHIMIZU, M.T. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, 35, p.203–207, 2002.

SFORCIN, J.M, FERNANDES J.R.A, LOPES, C.A.M., BANKOVA, , FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol*, 73, p.243-249, 2000.

SILVA, B.B; ROSALEN, P.L; CURY, J.A; IKEGAKI, M; SOUZA, C; ESTEVES,A; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian própolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5, p.313-316, 2007.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress on Computers In Agriculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: American Society of Agricultural Engineers. p.393-396, 2006.

SIQUEIRA, A.L. **Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*** – Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil, 2008.

TRUSHEVA B, POPOVA M, BANKOVA V, SIMOVA S, MARCUCCI MC, MIORIN PL, PASIN FR, TSVETKOVA I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. e CAM 3, p.249-254, 2006.

TRUSHEVA, B., TRUNKOVA, D.; BANKOVA, Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. [on line] *Chemistry Central Journal*, 1:13 doi:10.1186/1752-153X-1-13. 2007.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, 34, p.159-163, 2004.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey, USA: Prentice Hall, 1999.

CAPÍTULO III – ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO FRANCISCO

ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E AVALIAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS DA REGIÃO DA FOZ DO RIO SÃO FRANCISCO

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTION AND CHEMICAL EVALUATION OF PROPOLIS EXTRACTS OF ESTUARIAL REGION OF SÃO FRANCISCO RIVER - BRAZIL

RESUMO

Este trabalho visou caracterizar quimicamente e pelo Teste de Sensibilidade Antimicrobiana – TSA os extratos de própolis coletados na região da foz do Baixo São Francisco - BSF. O TSA foi avaliado frente a linhagens-padrão de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, e contra uma cepa bacteriana isolada de alimentos, a fim de verificar se a atividade antimicrobiana está relacionada aos teores de compostos fenólicos e flavonóides encontrados nessas amostras. Neste estudo foi realizado inicialmente um *screening* com vinte e cinco amostras de própolis coletadas na região do BSF e testadas quanto à atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Escherichia coli* (ATCC 1284) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Após o *screening*, foram selecionadas dez amostras que apresentaram melhor perfil antimicrobiano para realização dos testes subsequentes, todas as amostras selecionadas apresentavam coloração vermelha. Os resultados demonstraram que das vinte e cinco amostras de própolis coletadas, 92% apresentaram atividade frente a *Staphylococcus aureus*, 72% frente a *Escherichia coli* e 44% frente a *Candida parapsilosis*. As dez amostras selecionadas inibiram as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*, e seis amostras inibiram o fungo *Aspergillus nidulans*, mas todas apresentaram uma atividade antimicrobiana reduzida contra as bactérias Gram-negativas testadas. Quanto ao teor de flavonóides, 70% das amostras de própolis atendem o valor mínimo de 0,25% (m/m) exigido pelo Ministério da Agricultura, assim como os teores de compostos fenólicos onde todas as amostras demonstraram valores superiores que o exigido de 0,50% (m/m). No entanto, não houve relação entre TSA com teor de flavonóides e teor de compostos fenólicos. As dez amostras de própolis vermelha apresentaram atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o radical DPPH[•]. Pode-se concluir que as amostras de própolis de coloração vermelha encontradas no litoral sergipano possuem propriedades biológicas diferenciadas de outras variedades encontradas na região e apresentam grande potencial a ser explorada na área de biotecnologia de produtos naturais.

Palavras-chave: Avaliação química, própolis vermelha, microbiologia.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the antimicrobial and antioxidant activity of propolis samples collected at the San Francisco River Estuary Region, by testing them against type-strains of Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi, and against a bacterial strain isolated from food, and to determine whether the antimicrobial activity is related to levels of flavonoids and phenolic compounds found in these samples. A preliminary screening of twenty-five propolis samples collected at the San Francisco River Estuary Region was conducted, by testing the extracts for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Escherichia coli* (ATCC 1284) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Based on this screening, ten red propolis samples showing the best antimicrobial performance were selected for further testing. According to our results, out of twenty-five samples of propolis collected, 92% inhibited *Staphylococcus aureus*, 72% inhibited *Escherichia coli* and 44% inhibited *Candida parapsilosis*. The ten selected samples inhibited the Gram-positive bacteria *Staphylococcus epidermidis* and *Bacillus cereus*, and six samples inhibited the fungus *Aspergillus nidulans*, however these samples showed low antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. As for the content of flavonoids, 70% of the samples of propolis meet the minimum value of 0.25% (m/m) required by the Brazilian Ministry of Agriculture, and all samples showed higher phenolic content than the minimum required by the Ministry, which is 0.50% (m/m). However, no correlation was observed between the antimicrobial activity and the composition of flavonoids and phenols in propolis. The ten samples of red propolis showed antioxidant activity, and were able to reduce the DPPH• radical. It was concluded that samples of red propolis found on Sergipe coast have different biological properties than other varieties found in the region and have great potential for use in biotechnology of natural products.

Keywords: chemical evaluation, red propolis, microbiology.

3. INTRODUÇÃO

Nascimento *et al.* (2000) discutiram que o problema da resistência microbiana encontra-se em franca expansão, entretanto, ações podem ser tomadas para o surgimento de novos fármacos com potencial antimicrobiano a partir de pesquisas com produtos sintéticos ou naturais. A diversidade molecular encontrada nos produtos naturais é bastante superior àquela derivada dos processos de síntese química (ORLANDO, 2005). A enorme complexidade de metabólitos sintetizados pelas plantas recebe influência de diversas variáveis ambientais, de natureza química, biológica e física, que agem sobre sua composição, o que resulta muitas vezes na síntese de moléculas de estruturas complexas e com grande diversidade de esqueletos e grupos químicos funcionais (ALVES, 2001).

Há mais de 100 milhões de anos as abelhas têm co-evoluído com as angiospermas (PROCTOR *et al.*, 1996) e um dos subprodutos dessa relação é a própolis, um dos produtos naturais mais conhecidos e utilizados pelas sociedades modernas, que é composta por uma complexa mistura de substâncias que as abelhas coletam, elaboram e depositam em seus ninhos, com a finalidade de vedar e proteger a colmeia (LONGHINI, 2007). Esse material resinoso é processado pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de várias fontes vegetais (BANKOVA, 2005).

Por possuir propriedades farmacêuticas a própolis é uma importante alternativa terapêutica importante do ponto de vista econômico e da eficácia farmacológica (SOARES *et al.*, 2006). Segundo Kosalec *et al.* (2005), pesquisas relacionadas com própolis tem se mostrado muito importantes devido seu amplo espectro de efeitos, incluindo suas propriedades antioxidantes e antibacterianas conferidas pela presença de flavonóides, ácidos fenólicos, ácidos aromáticos e ésteres em sua composição, a ação bactericida atribuída à presença dos ácidos ferúlico e cafeico, antifúngicas, antivirais em função da ação de flavonóides e derivados de ácidos aromáticos, antiinflamatórias atribuída à presença do ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o éster fenetílico do ácido cafeico. Os flavonóides, considerados o principal componente antioxidante da própolis, formam complexos com íons metálicos e exercem um importante papel no processo de detoxificação de metais pesados (HAVSTEEN, 2002).

Bankova *et al.* (1995) sugeriram que as própolis brasileiras possuem baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, e altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos. Um baixo teor de flavonóides, da ordem de 0,04 a 0,5%, foi determinado em variedades de própolis do Nordeste brasileiro (SILVA *et al.*, 2006).

Vargas *et al.* (2004) verificaram que estudos realizados com extratos etanólicos de própolis proveniente de Santa Maria/RS, demonstraram atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de 67,7% das bactérias testadas, sendo que 92,6% dos isolados Gram positivos, dentre eles 46 cepas de *Staphylococcus sp.*, e 42,5% dos Gram negativos, dentre estes 29 de *Pseudomonas aeruginosa* e 20 de *Escherichia coli*.

Bittencourt (2008) concluiu que o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha do litoral norte do estado de Sergipe inibiu *Candida albicans* ATCC 10231 e apresentou ação fungicida em uma concentração de 347,7 µg/mL. Grange e Davey (1990) descreveram que extrato etanólico da própolis francesa (60 mg/mL) e seus constituintes são ativos contra várias bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.* e *Bacillus cereus* e parcialmente inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e não houve nenhum efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*.

As própolis avaliadas nesse estudo são provenientes da região do Baixo São Francisco (BSF), que está localizada na quarta zona fisiográfica à montante do rio São Francisco, com limite superior na cidade de Belo Monte, estado de Alagoas e se estende até a foz no oceano Atlântico, entre os estados de Sergipe e Alagoas (ANA, 2008). A região da foz do São Francisco compreende a região formada pelos municípios ribeirinhos sergipanos e alagoanos localizados na região do extremo norte de Sergipe e extremo Sul de Alagoas, incluindo os municípios de Santana do São Francisco, Neópolis, Ilha das Flores, Brejo Grande e Pacatuba, no estado de Sergipe e Penedo e Piaçabuçu no estado de Alagoas.

Este estudo visa contribuir com o desenvolvimento da apicultura da Região do Baixo São Francisco, uma região onde esta atividade já é bastante presente, principalmente para a produção de pólen apícola, mas que ainda não conta com produção de própolis, que representa um potencial ainda não explorado, apesar das diversas variedades existentes e da própolis vermelha ser o tipo de própolis mais encontrado nos apiários da região.

No município de Brejo Grande/SE, existe uma Associação de Criadores de Abelhas e Artesãos, que atualmente trabalha com esta atividade econômica. Eles mantêm na comunidade de Brejão dos Negros uma unidade de processamento de pólen apícola, nessa região predominam as antigas fazendas de côco e áreas ainda bastante preservadas de restinga e manguezais, favorecendo a criação de abelhas, incluindo mais de uma dezena de apiários (ARAÚJO, 2008).

A própolis vermelha vem sendo estudada por apresentar características físico-químicas e biológicas diferenciais. Dausch (2007) mencionou essa variedade como um novo tipo de própolis de coloração vermelha, de colmeias encontradas ao longo da praia e dos rios do nordeste do Brasil, classificada como própolis do grupo 13. Trabalhos realizados com

amostras de própolis vermelha proveniente do litoral norte do estado de Sergipe apresentaram ação antifúngica (BITTENCOURT, 2008), antibacteriana (SIQUEIRA, 2008) e atividade de reparo cicatricial de segunda intenção em ratos (BARRETO, 2008). Nenhum registro foi encontrado na literatura envolvendo a avaliação da atividade antimicrobiana de outras variedades de própolis também encontradas na Região.

Esse trabalho visou analisar a atividade antimicrobiana e antioxidante de amostras coletadas na região da foz no Baixo São Francisco e testá-las contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos de linhagens padrão e uma cepa bacteriana isolada de alimentos, a fim de verificar se a atividade antimicrobiana está relacionada aos teores encontrados de compostos fenólicos e flavonóides nessas amostras.

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foi realizado um *screening* com vinte e cinco extratos hidroalcóolicos de amostras de própolis coletadas na região da foz do rio São Francisco. Estas amostras foram testadas inicialmente frente a três cepas padrão de microrganismos, a saber: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Escherichia coli* (ATCC 1284) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Dentre estas foram selecionadas dez amostras, aquelas com os melhores perfis no Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA), que foram testadas contra os demais microrganismos: bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e duas espécies de fungo, além da realização de testes químicos. O fluxograma descrito na Figura 3.1 mostra as etapas realizadas neste estudo.

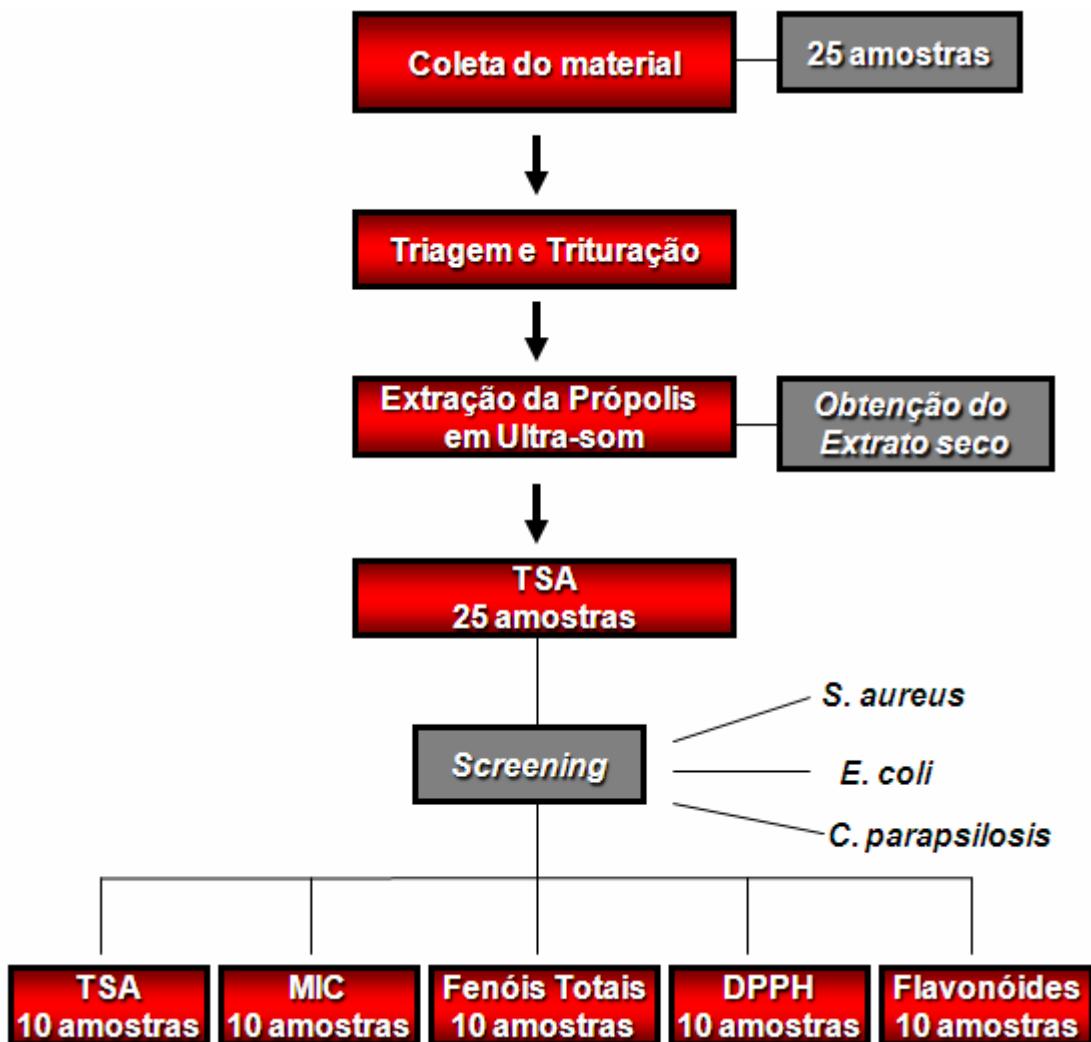


Figura 3.1 - Fluxograma: etapas desenvolvidas no estudo das amostras de própolis coletadas na região da foz do rio São Francisco.

3.1.1. Coleta de Campo

A coleta das amostras de própolis, realizada na região da foz no Baixo São Francisco. Foi realizada no mês de dezembro de 2007, em cinco apiários, sendo quatro no município de Brejo Grande/SE e um apiário no município de Piaçabuçu/AL (Figura 3.2). Foram coletadas no total 25 amostras de própolis, sendo cinco amostras de cada apiário. As amostras foram coletadas da parte interna da tampa da caixa e das frestas (caixa racional modelo Langstroth) e levadas ao Laboratório de Biologia Tropical do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (LBT/ITP) para triagem, sob estereomicroscópio, e Trituração da amostra de própolis utilizando grau e pistilo. Em seguida, as amostras foram acondicionadas a -20°C.

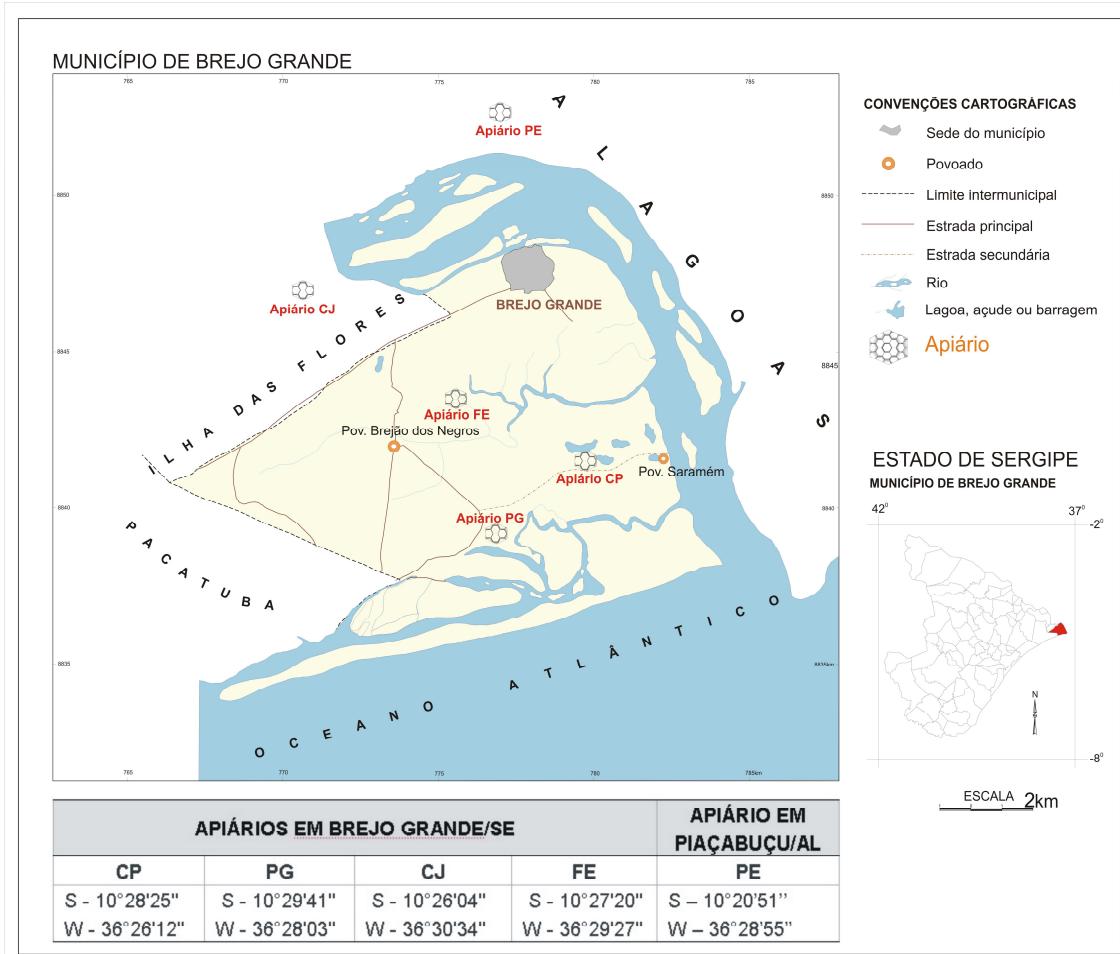


Figura 3.2 – Localização geográfica dos 5 apiários amostrados na região da foz do rio São Francisco. Apiário Capivara (CP), Apiário Pau-da-Gamela (PG), Apiário Cajuípe (CJ), Apiário Fernandinho (FE) e Apiário Piaçabuçu/Penedo (PE).

3.1.2. Preparo do extrato bruto hidroalcoólico de própolis (EBHP)

A extração foi realizada em banho com ultra-som, onde 1 g de cada amostra de própolis foi colocado em tubo de ensaio estéril com rosca (tipo Falcon), extraído com 12,5 mL de etanol a 70% durante 1 h, sendo em seguida centrifugado. Todos os EBHP obtidos ao final do processamento foram filtrados e armazenados a -20°C para a etapa posterior de obtenção do extrato seco.

3.1.3. Obtenção do extrato seco de própolis

Os extratos obtidos foram deixados em capela de exaustão no Laboratório de Estudos Ambientais (LEA) para que o solvente fosse totalmente eliminado e em seguida

deixado em dessecador com sílica para eliminação da água, sendo as placas monitoradas até peso constante. Após este processo, foi obtida a massa seca de cada extrato de própolis.

O rendimento de cada extrato foi calculado em relação à massa inicial da própolis antes da extração e expresso em porcentagem. Para o teste da atividade antimicrobiana os extratos obtidos foram ressuspensos na concentração de 5% (50 mg/mL) em etanol a 70%.

3.1.4. Cepas utilizadas

As cepas foram bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de uma levedura e um fungo. Algumas cepas foram disponibilizadas pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Sergipe - LMA/UFS, outras cepas fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ e uma cepa isolada em alimentos e cedida pelo Laboratório de Microbiologia em Alimentos da Universidade Federal da Bahia – UFBA (Tabela 3.1).

Após o screening, onde foram usados os microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 1284), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), foram testados os demais microrganismos, sendo as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e o *Bacillus cereus* (cepa isolada em alimentos, identificada e cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Bahia – UFBA) e as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 1238) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), além do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* (INCQS 40022).

Tabela 3.1 – Banco de origem e principais características biológicas dos microrganismos usados no estudo.

Cepas	Origem	Histórico	Patogenicidade
<i>Staphylococcus aureus</i>	LMA/UFS	ATCC 12600	Responsável por infecções superficiais como abscessos cutâneos e infecções de feridas. Pode causar infecções sistêmicas como osteomielite, endocardite, pneumonia e septicemia.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LMA/UFS	ATCC 1238	Patógeno nosocomial, pode ser encontrado em pias de hospitais, equipamentos para terapia respiratória

Staphylococcus epidermidis

LMA/UFS ATCC 12228

e soluções anti-sépticas ou mesmo detergentes. Possui alta resistência a diversos tipos de antibióticos, seja ela intrínseca ou adquirida. É capaz de se proliferar em água destilada e em águas minerais. Coloniza os pulmões de pacientes queimados e é um dos principais agentes infecciosos em casos de pneumonia, infecção urinária, infecção de feridas cirúrgicas e bacteremias.

Sua patogenicidade está relacionada a sua capacidade de aderir a superfícies formando um biofilme. Este biofilme funciona como um reservatório de bactérias, dificulta a penetração de antimicrobianos e dos elementos de defesa do organismo. As principais doenças estão associadas a dispositivos médicos implantados como cateteres e próteses, podendo variar de acordo com a localização.

Bacillus cereus

LMA/UFBA

-

Causa intoxicação alimentar, podendo manifestar-se através de vômitos como por diarréia. O alimento mais comumente implicado é o arroz, carnes e vegetais. A forma diarréica é mediada por uma toxina termolábil semelhante a toxina colérica.

Escherichia coli

LMA/UFS ATCC 1284

É tida como habitante natural da microbiota do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente. Algumas espécies são

			enteropatogênicas e podem causar de surtos de diarréia neonatal que ocorre freqüentemente em berçários hospitalares. Apesar disso, pode causar infecção urinária, meningite e outras infecções extra-intestinais.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	LMA/UFS	ATCC 13883	Bacilo Gram-negativo da família <i>Enterobacteriaceae</i> , pode ser encontrado em trato respiratório alto, trato gastro-intestinal e urinário, causando pneumonia lobar, infecção urinária e septicemia. <i>Klebsiella pneumoniae</i> pode causar pneumonia, bacteremia e infecções em outros órgãos.
<i>Aspergillus nidulans</i>	INCQS 40022 (FIOCRUZ)	ATCC 38163	Os fungos do gênero <i>Aspergillus</i> não crescem em tecidos saudáveis, pois não fazem parte da microbiota dos seres humanos, porém, causam doenças invasivas em indivíduos imunocomprometidos, podendo causar lesões como consolidação focal, pneumonia lobar, abscessos intracerebrais, úlceras necróticas de pele ou doença não-infecciosa como a asma.
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA/UFS	ATCC 22019	Um importante patógeno nosocomial em unidades de terapias intensivas neonatais. Prolifera em soluções com altas concentrações de glicose e forma extensas biofilmes em superfícies plásticas.

LMA/UFS – Laboratório de Microbiologia Aplicada; LMA/UFBA – Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

3.1.5. Preparo dos Meios de cultura

O preparo dos meios foi conforme a Descrição de Meios de Cultura da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008). Neste estudo foram usados dois tipos de meios de cultura; o Meio Müller Hinton para testes frente às bactérias e o Meio Sabouraud para os testes realizados com leveduras.

Os controles positivos usados para os testes foram os antimicrobianos comerciais de referência, sendo cloranfenicol e tetraciclina para as bactérias e fluconazol para os fungos, respeitado o perfil de sensibilidade de cada grupo e/ou individualidade dos microrganismos, e como controle negativo, o solvente utilizado na preparação do extrato, álcool a 70%.

3.1.6. Preparação e semeadura do inóculo

O preparo dos meios de cultura e do inóculo foram feitos conforme descrito no Capítulo II, item 3.1.6.

A semeadura dos microrganismos nos meios de cultura para a realização dos testes se fez com o auxílio de *swabs* estéreis umedecidos com as suspensões celulares. Os inóculos foram então espalhados uniformemente sobre a superfície dos meios ágar Müller Hinton, para as bactérias e Sabouraud, para a levedura e fungo. Após a secagem do inóculo foi então realizado a atividade antimicrobiana.

3.1.6.1. Atividade antimicrobiana

Após o semeio do inóculo, a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de própolis foram realizadas em triplicata pela técnica de poços. Os poços foram marcados com pipeta de vidro Pasteur estéril e em seguida foram succionados com o auxilio de um aparelho a vácuo, usando na extremidade uma ponteira estéril, todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

Alíquotas de 15 µL (750 µg) de cada extrato foram aplicadas nos poços e em seguida as placas foram incubadas numa temperatura e tempo ideal para cada microrganismo testado, sendo 24h a 36°C para as bactérias, 48 h a 35°C para a levedura e de 24 h a 48 h numa temperatura de 37°C para o fungo filamentoso.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela formação de halos de inibição, sendo tomadas às medidas com auxílio de um paquímetro digital.

3.1.6.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), frente às bactérias *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *B. cereus*, foi selecionado dez extratos hidroalcoólicos de própolis com os melhores perfis antimicrobianos. O meio de cultura utilizado foi o Caldo Müller Hinton, sendo ajustados conforme recomendação do *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS* (2003).

O MIC foi realizado pelo método de microdiluição em caldo segundo Dausch (2007) com algumas modificações, sendo usada placa de plástico estéril de 96 poços. Foram deixadas as duas últimas colunas da placa para os controles (negativo e positivo), sendo que o controle negativo na coluna 11 continha 100 µL de meio Müller Hinton e 100 µL de extrato de própolis e no controle positivo na coluna 12 continha 100 µL de meio Müller Hinton e 100 µL de meio com inóculo. O inóculo inicial (item 2.6) foi diluído em solução salina a 0,9% para chegar numa concentração final de 1×10^4 células/mL, a última diluição foi feita já com o meio Müller Hinton.

Foram pipetados inicialmente 100 µL do meio Müller Hinton em todos os poços. Em seguida foi colocado 100 µL de cada extrato de própolis na primeira coluna em suas respectivas linhas e feita diluição seriada para as linhas seguintes, sempre homogeneizando e retirando 100 µL para a próxima linha. Após as diluições foi pipetado 100 µL de meio Müller Hinton mais inóculo em cada poço, mantendo um volume final em cada poço de 200 µL. O procedimento foi realizado em duplicata.

As placas foram seladas com filme de PVC e incubadas por 24 h a 36°C. Após este período as placas foram avaliadas e a leitura do MIC definida como a menor concentração capaz de impedir o crescimento da bactéria. A Figura 3.3 apresenta um desenho esquemático do procedimento do MIC.

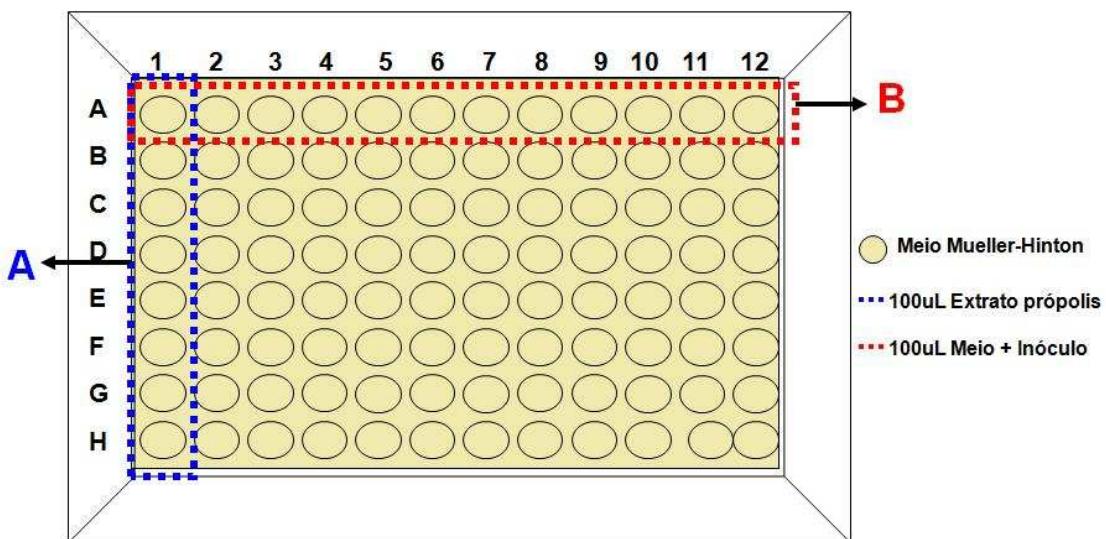


Figura 3.3 – Esquema da técnica de microdiluição em caldo para determinação do MIC.

3.1.7. Análise do teor de flavonóides

A análise do teor de flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos de própolis foi realizada no LPNS por reação colorimétrica. Inicialmente foi preparada uma curva analítica com o padrão quercetina. Para obtenção da curva-padrão, foram utilizadas soluções de quercetina em diferentes concentrações (20, 40, 60 e 80 e 100 µg/mL) (KOSALEC *et al.*, 2005).

Para o teste foram usados: 1,0 mL da amostra diluída (1:10), 3,0 mL etanol a 95%, 0,5 mL nitrato de alumínio 10%, 0,2 mL de acetato de potássio e 5,6mL de água destilada. O branco foi preparado com 1,0 mL amostra diluída, 3,0 mL etanol a 95%, 0,2 mL acetato de potássio 1 M e 5,8 mL de água destilada (ADELMANN, 2005). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 415 nm em espectrofotômetro digital DR 2300 Hach. Todo o procedimento foi realizado em triplicata. O teor de flavonóides foi calculado empregando-se a curva analítica de quercetina.

3.1.8. Análise de Compostos Fenólicos Totais

Para determinação dos fenóis totais das amostras de própolis foi construída inicialmente uma curva analítica com o padrão ácido gálico. A concentração foi medida utilizando o método de Folin-Ciocalteu conforme Lee *et al.* (2003) e Funari e Ferro (2006) com modificações.

Para o preparo da curva-padrão foi pesado 0,010 g de ácido gálico em um balão de 100 mL com água destilada, sendo esta considerada a solução mãe (100 µg/mL). Em seguida foram preparados diluições nas concentrações finais de 0,25 mL, 0,375 mL, 0,5 mL, 0,625 mL, 0,750 mL, 0,875 mL, 1,0 mL e 1,25 mL, sendo adicionado em cada balão 1,25 mL de Folin-Ciocalteu e aguardado o tempo de 2 minutos. Em seguida foram adicionados 2,5 mL da solução saturada de Na₂CO₃, completando o volume do balão com água destilada, homogeneizado e aguardado o tempo de trinta minutos. Foi preparado em paralelo o padrão branco, sem o ácido gálico. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 760nm, no espectrofotômetro UV/VIS digital, marca Perkin Elmer, modelo U-2001.

Para o preparo da amostra foram utilizados balões de 25 mL, contendo 10mL de água destilada, 0,075 mL da amostra, 1,0 mL de Folin-Ciocalteu e aguardado o prazo de repouso de cinco minutos. Em seguida foram adicionados 10 mL de solução saturada de Na₂CO₃ e o volume do balão completado com água destilada e aguardados trinta minutos para a realização da leitura em espectrofotômetro. Os teores de ácidos fenólicos totais das amostras foram expressos como equivalentes de ácido gálico em microgramas por grama de própolis (µg fenol/g própolis). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

3.1.9. Medida da atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH•

A metodologia utilizada foi segundo Blois (1958). Para o preparo do controle positivo foi usado em tubo de ensaio 1 mL de tampão acetato de sódio (100 mM) pH 5,5, 1,0 mL de álcool etílico (95 %) e 500 µL solução alcoólica de DPPH• (200 mM). No preparo da amostra foram utilizados os mesmos reagentes que o controle positivo e mais 50 µL de amostra. O parâmetro branco foi preparado com 1,0 mL de tampão acetato de sódio e 1,5 mL de álcool etílico (95 %). Depois de 10 minutos foi realizada leitura em 517 nm, em espectrofotômetro Hitachi U2001.

3.1.10. Análise Estatística

A diferença entre as médias dos halos de inibição obtidos nas quatro técnicas de extração de própolis foi determinada com auxílio do programa *Assistat 7.5 beta*. Aplicou-se análise de variância (ANOVA), sendo que as diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey para comparação de médias. Diferenças entre as médias ao nível de 1% ($p<0,01$) foram consideradas significativas (ZAR, 1999).

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico de própolis (EBHP) e do resíduo seco.

Os extratos obtidos em ultra-som por 1 h apresentaram uma diferença de coloração entre amarelo claro esverdeado, passando por verde médio a vermelho claro e vermelho escuro (figura 3.4).

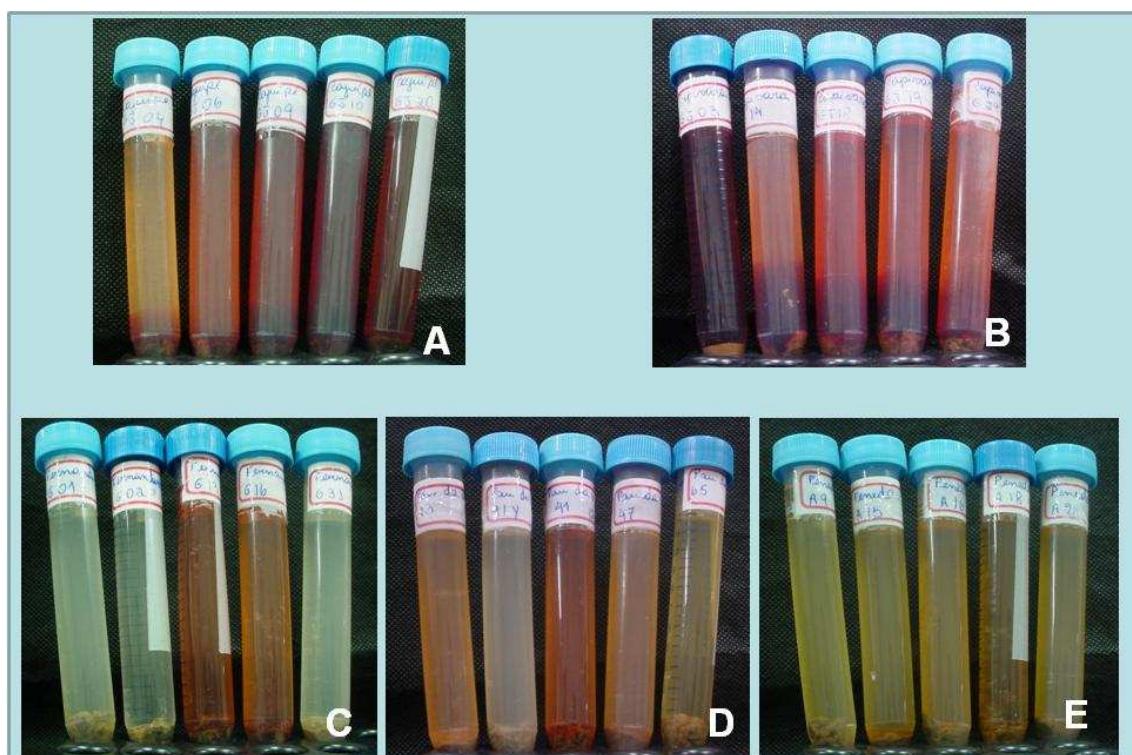


Figura 3.4 – Extratos obtidos a partir do processo em ultra-som 1h. a) Amostras do apiário CJ; b) Amostras do apiário CP; c) Amostras do apiário FE; d) Amostras do apiário PG; e) Amostras do apiário PE.

Quanto ao rendimento do extrato seco (Figura 3.5), 36% do total das amostras apresentam-se acima do valor determinado pelo Ministério da Agricultura, que é de no mínimo 11% (BRASIL, 2001).

Dentre os apiários visitados neste estudo, apenas no Apiário CP todas as amostras (03, 14, 18, 19 e 29) apresentaram rendimento acima do valor preconizado pelo Ministério da Agricultura. No Apiário CJ 3 amostras (09, 10 e 20) apresentaram rendimento superior a 11% e no apiário PE apenas uma amostra (18) apresentou rendimento satisfatório. Por outro lado, o rendimento de todas as amostras coletadas nos Apiários PG (13, 41, 41Y, 47 e 65) e

FE (01,02,13,16 e 31) estavam abaixo deste valor. A Figura 3.5 ilustra o rendimento de cada amostra em cada apiário.

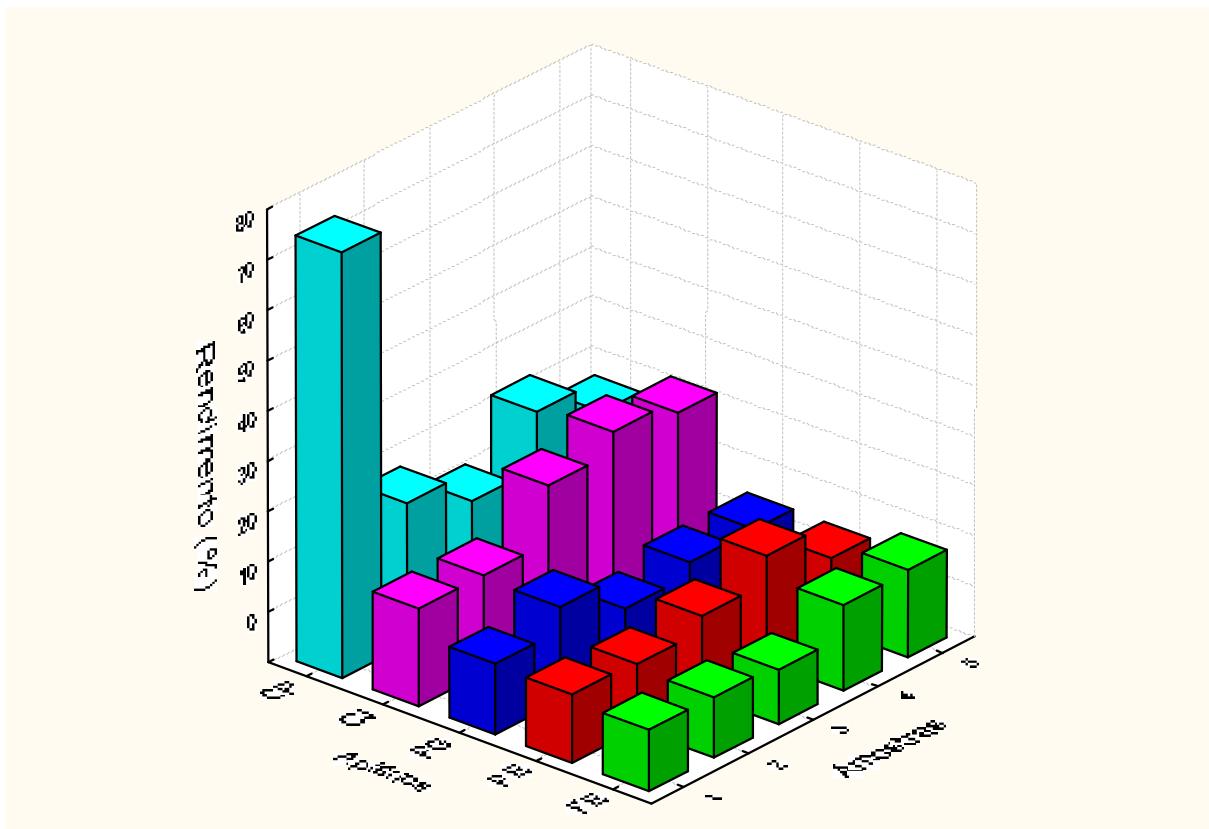


Figura 3.5 – Rendimento em extrato seco de própolis proveniente dos cinco apiários do BSF.

Segundo Park *et al.* (1997) e Bankova *et al.* (2000), a própolis apresenta características diferenciadas de acordo com sua localização geográfica, e sua composição química está relacionada ao clima, às características genéticas das abelhas, à metodologia de condução de ensaios e à época do ano em que foi produzida a própolis. Todavia, os resultados aqui apresentados sugerem que a atividade de forrageamento pode variar entre as colmeias de um mesmo apiário. Talvez as características genéticas da rainha e hábitos de forrageamento das operárias possam estar relacionados a essa questão, fatos também comentados por Silva *et al.* (2006). Quando foram analisadas caixas de um mesmo apiário (vide Figuras 3.5), é possível perceber que caixas de um mesmo apiário apresentaram amostras de própolis diferentes entre si, o que sugere que a escolha da planta para a coleta da resina pelas abelhas operárias seja diferenciada entre estas caixas. Esta variável, portanto, é importante na determinação do rendimento final das amostras de própolis.

O sistema de produção de própolis também pode induzir à diferença de rendimento final do resíduo seco, pois estas coletas foram realizadas utilizando própolis retiradas das frestas e das tampas das caixas. Estudos futuros que sejam realizados no mesmo apiário, com as mesmas caixas e em condições ambientais próximas às deste estudo, porém com coletores de própolis acoplados a estas caixas, poderão fornecer resultados diferentes de rendimento. O rendimento também pode estar relacionado ao tamanho da partícula da própolis, ao solvente e volume do solvente extrator, ao método e ao tempo de extração.

3.2.2. Determinação da atividade antimicrobiana

3.2.2.1. Screening da atividade antimicrobiana das 25 amostras de própolis coletadas na região da Foz do rio São Francisco.

A atividade antimicrobiana é medida *in vitro* para determinar a resistência ou a sensibilidade de microrganismos a drogas sintéticas ou naturais. Dentre as 25 amostras de própolis coletadas neste estudo, 92% apresentaram atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* (Figura 3.6), 72% frente à *Escherichia coli* e 44% para *Candida parapsilosis* (Tabela 3.2).

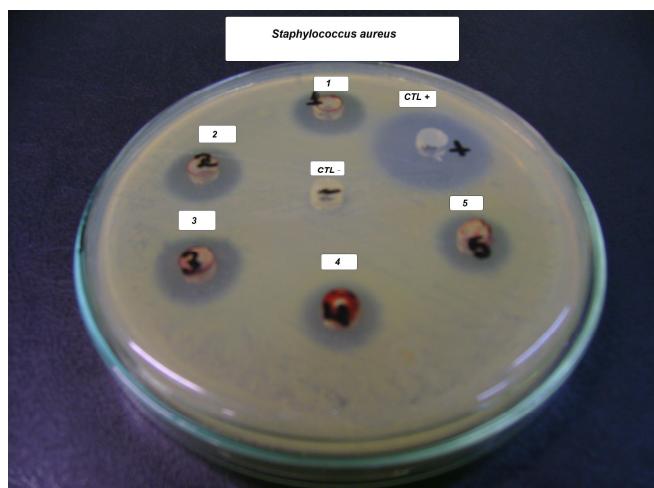


Figura 3.6 – Atividade antimicrobiana de extrato da própolis do Apiário CJ frente a *Staphylococcus aureus*.

A escolha das dez amostras de própolis coletadas na região do Baixo São Francisco foi baseada no perfil de sensibilidade antimicrobiana. Dentre os extratos das vinte e cinco amostras de própolis, os apiários que apresentaram mais de 50% de inibição das suas amostras frente a *S. aureus* foram os apiários CP e CJ. Para os testes realizados com *E. coli* e *C. parapsilosis* o apiário CP foi o que apresentou o melhor desempenho

antimicrobiano. Não foram identificadas diferenças ambientais marcantes entre os apiários em termos fisionômicos ou fitossociológicos na vegetação que permitissem qualquer explicação sobre a diferença encontrada entre as própolis analisadas, mas estudos pormenorizados sobre esse aspecto poderão ser muito úteis para descobertas sobre a origem botânica das variedades encontradas. A partir deste resultado foram escolhidas as amostras dos apiários CP e CJ para realização dos testes antimicrobianos com os demais microrganismos. Os resultados do screening estão descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Atividade antimicrobiana dos vinte e cinco extratos de própolis frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida parapsilosis*.

Apiário	Cor	Média em diâmetro (mm)		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. parapsilosis</i>
CP 03	■	11,7 ± 2,89 ^{cdefg}	12,4 ± 0,58 ^a	12,4 ± 0,58 ^a
CP 14	■	11,7 ± 1,15 ^{cdefg}	11,7 ± 0,58 ^{ab}	12,0 ± 1,00 ^a
CP 18	■	15,4 ± 0,58 ^{abc}	11,0 ± 0,00 ^{abc}	11,0 ± 1,00 ^{abc}
CP 19	■	13,4 ± 1,15 ^{abcde}	11,0 ± 1,00 ^{abc}	11,4 ± 1,15 ^{ab}
CP 29	■	14,0 ± 1,00 ^{abcd}	12,0 ± 0,58 ^{ab}	10,0 ± 0,00 ^{bcd}
CJ 04	■	15,4 ± 1,53 ^{abc}	9,0 ± 1,00 ^{de}	0,0 ± 0,00 ^e
CJ 06	■	16,0 ± 0,00 ^{ab}	10,4 ± 0,58 ^{bcd}	9,7 ± 0,58 ^{cd}
CJ 09	■	17,0 ± 0,00 ^a	9,7 ± 0,58 ^{cde}	9,4 ± 0,58 ^d
CJ 10	■	14,4 ± 0,58 ^{abcd}	9,0 ± 1,00 ^{de}	9,7 ± 0,58 ^{cd}
CJ 20	■	12,7 ± 1,15 ^{bcd}	8,4 ± 0,58 ^{ef}	0,0 ± 0,00 ^e
FE 01	■	9,7 ± 0,58 ^{efg}	8,0 ± 0,00 ^{ef}	0,0 ± 0,00 ^e
FE 02	■	0,0 ± 0,00 ^h	7,0 ± 0,00 ^f	0,0 ± 0,00 ^e
FE 13	■	14,4 ± 0,58 ^{abcd}	10,7 ± 1,15 ^{abcd}	9,0 ± 0,00 ^d
FE 16	■	16,7 ± 1,53 ^a	11,0 ± 1,00 ^{abc}	10,4 ± 0,58 ^{bcd}
FE 31	■	9,0 ± 1,00 ^{fg}	7,0 ± 0,00 ^f	0,0 ± 0,00 ^e
PG 13	■	11,0 ± 1,00 ^{defg}	8,0 ± 0,00 ^{ef}	0,0 ± 0,00 ^e
PG 41	■	15,0 ± 1,00 ^{abc}	9,0 ± 1,00 ^{de}	9,7 ± 0,58 ^{cd}
PG 41Y	■	8,7 ± 0,58 ^g	0,0 ± 0,00 ^g	0,0 ± 0,00 ^e
PG 47	■	0,0 ± 0,00 ^h	0,0 ± 0,00 ^g	0,0 ± 0,00 ^e
PG 65	■	10,0 ± 2,65 ^{efg}	8,0 ± 1,00 ^{ef}	0,0 ± 0,00 ^e
PE 09	■	8,4 ± 0,58 ^g	0,0 ± 0,00 ^g	0,0 ± 0,00 ^e
PE 15	■	8,4 ± 0,58 ^g	0,0 ± 0,00 ^g	0,0 ± 0,00 ^e
PE 16	■	8,4 ± 0,58 ^g	0,0 ± 0,00 ^g	0,0 ± 0,00 ^e
PE 18	■	9,7 ± 0,58 ^{efg}	0,0 ± 0,00 ^g	0,0 ± 0,00 ^e
PE 28	■	8,4 ± 0,58 ^g	0,0 ± 0,00 ^g	0,0 ± 0,00 ^e

* Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente iguais ($p<0,01$).

A maior parte das amostras dos apiários FE, PG e PE demonstraram um menor nível de atividade frente a *S. aureus*. No entanto, vale ressaltar que houve uma relação direta entre a cor da própolis e sua atividade antimicrobiana para *S. aureus*, uma vez que todos os halos de inibição superiores a 11 mm para esse microrganismo foram obtidos a partir de própolis vermelhas. Os apiários FE e PG apresentaram resultados de inibição que variaram

de zero a 16,7mm para *S. aureus*, sendo os quatro melhores resultados associados à própolis vermelha e nenhum resultado insatisfatório esteve associado a essa variedade de própolis. Segundo Marcucci (1996), a própolis possui componentes biológicos modificados através da flora ou mesmo de condições sazonais, sendo assim, estas amostras analisadas em outra situação poderiam apresentar resultado diferente do apresentando neste estudo.

Quando comparados os resultados de atividade antimicrobiana das própolis frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*, verifica-se que a bactéria Gram-positiva *S. aureus* demonstra maior sensibilidade frente os extratos testados, sendo que as amostras provenientes do apiário PE de Piaçabuçu – AL sequer formaram halos de inibição quanto testadas com *E. coli* (Tabela 3.2). Esses resultados corroboram os resultados dos testes realizados por Antunes *et al.* (1996), segundo os quais das 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas testadas as mais sensíveis à própolis foram as bactérias Gram-positivas. Apesar dos halos formados terem sido em média de menor magnitude para *E. coli*, também é possível observar um melhor desempenho das própolis de coloração vermelha (Tabela 3.2)

Para o teste realizado com *C. parapsilosis*, em torno de 56% das amostras de própolis não apresentaram ação antifúngica para esta cepa, sendo que as 44% que apresentaram formação de halos de inibição eram da cor vermelha, observa-se também que algumas amostras de própolis vermelha (5 amostras) não apresentaram halos de inibição. As amostras dos apiários CP e CJ foram as que mais apresentaram inibição frente a esta cepa.

Vários estudos com a própolis evidenciaram preocupação com este microrganismo. Sawaya *et al.* (2002), encontraram atividade de extratos de própolis provenientes do estado de São Paulo frente às espécies de *Candida*, entre as quais *C. parapsilosis*, que foi inibida com uma concentração de 10.000 µg e 20.000 µg apresentando halo de inibição de 8 mm na técnica de difusão em agar usando cilindros na superfície do agar. Neste estudo, parte das amostras de própolis do Baixo São Francisco demonstrou ação frente a *C. parapsilosis* na concentração de 750 µg em cada poço, com a formação de halos de inibição de 9,0 a 12,0 mm.

Dentre os cinco apiários analisados neste estudo, os Apiários CP e CJ produziram variedades de própolis significativamente mais ativas quanto ao perfil de sensibilidade antimicrobiana para os três microrganismos testados, enquanto as amostras de própolis produzidas nos apiários FE, PG e PE foram menos significativas, quando testada apenas a sensibilidade antimicrobiana, embora existam exceções para algumas amostras.

3.2.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana das 10 amostras selecionadas de própolis.

As 10 amostras de própolis selecionadas neste estudo são todas provenientes do município de Brejo Grande/SE. Estas própolis apresentam cor vermelha, variando de claro a intenso (Figura 3.7), e dentro da categoria das própolis brasileiras estas amostras coletadas no estado de Sergipe se enquadram no grupo 13 (DAUSCH, 2007).

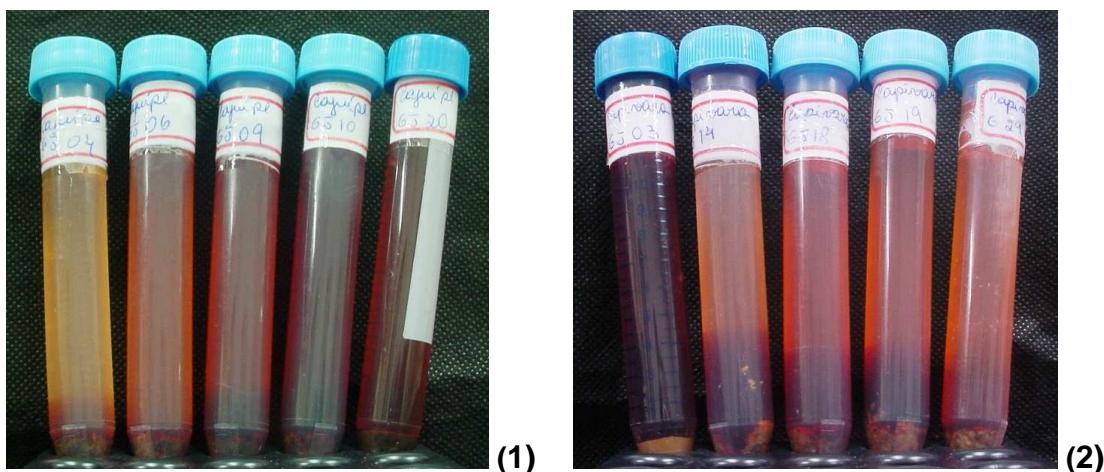


Figura 3.7 – (1) amostras do apiário CJ; (2) amostras do apiário CP.

As amostras selecionadas dos apiários CP e CJ apresentaram inibição frente às bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*) (Figuras 3.8 e 3.9), e frente ao fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*.

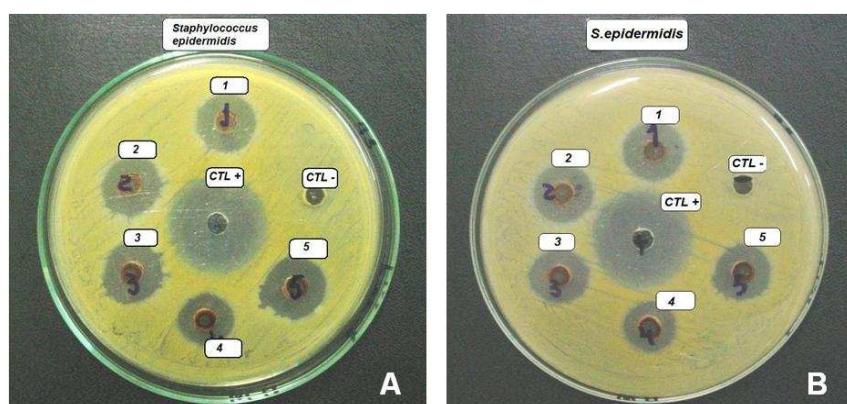


Figura 3.8 – Atividade antimicrobiana do extrato da própolis frente a *S. epidermidis*. A) Amostras do apiário CJ e B) Amostras do apiário CP.

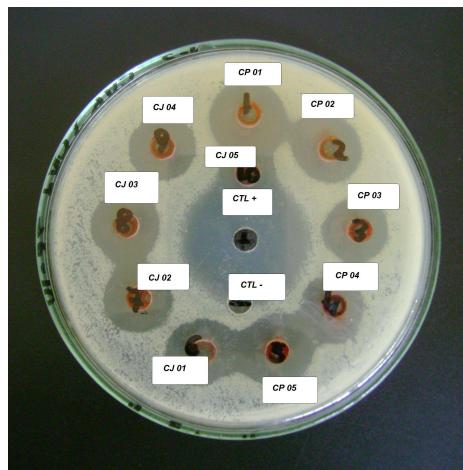


Figura 3.9 – Atividade antimicrobiana do extrato da própolis dos apiários CP e CJ frente a *B. cereus*.

Os halos de inibição variaram de 12,7 a 16,4 mm para *S. epidermidis*, de 14,0 e 18,4 mm para *B. cereus*, e de 9,4 a 12,4 mm para *A. nidulans*. Todas as 10 amostras demonstraram atividade para *S. epidermidis* e *B. cereus*, porém, apenas as amostras CP 03, CP 14, CP 29, CJ 06, CJ 09 e CJ 10 apresentaram ação frente a *Aspergillus nidulans*. Os resultados estão descritos na Tabela 3.3.

A ação da própolis frente aos microrganismos neste estudo é comprovada em trabalhos de Marcucci *et al.* (1996) que verificaram atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis contra linhagens de bactérias Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Atividade inibitória também foi observada com extratos etanólicos de própolis frente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus* (GRANGE & DAVEY 1990).

Diversos autores apontaram a atividade da própolis frente a cepas *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *Streptococcus sp* (β -hemolítico) (MARCUCCI 1995). MENEZES *et al.* (1997) também observaram que extratos etanólicos de própolis em preparações comerciais como tabletes, cápsulas e pós contendo própolis têm ação frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*.

Neste estudo o fungo *Aspergillus nidulans* foi inibido por 60% das amostras de própolis testadas, com halos de inibição entre 9,0 e 12,4 mm quando 750 μ g de extrato foi aplicado em cada poço. Extratos de própolis já foram testados frente a diversos fungos e leveduras. O efeito fungicida pode estar relacionado à ocorrência de pinocembrina na própolis e inibe a produção da ocratoxina A produzida por *Aspergillus sulphureus* (METZNER, SCHNEIDEWIND, FRIEDRICH, 1977; BURDOCK, 1998). Pepelnjak *et al.*

(1982) investigaram a ação de própolis frente a *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 e verificaram a inibição da biossíntese de ocratoxina A por este fungo em todas as concentrações de própolis testadas sendo que apenas a concentração de 2,0 mg/mL de própolis apresentou atividade fungistática definitiva.

Tabela 3.3 – Atividade antimicrobiana dos 10 extratos de própolis frente à *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* e *Aspergillus nidulans*.

Amostra	Média em diâmetro (mm)		
	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>A. nidulans</i>
CP 03	16,4 ± 0,58 ^a	18,4 ± 0,58 ^a	12,4 ± 1,15 ^a
CP 14	15,7 ± 0,58 ^{ab}	16,7 ± 0,58 ^b	10,7 ± 0,58 ^{ab}
CP 18	15,0 ± 1,00 ^{ab}	15,7 ± 0,58 ^{bc}	0,0 ± 0,00 ^c
CP 19	12,7 ± 1,53 ^b	15,0 ± 0,00 ^{cd}	0,0 ± 0,00 ^c
CP 29	15,4 ± 1,53 ^{ab}	16,4 ± 0,58 ^b	10,0 ± 0,00 ^b
CJ 04	13,7 ± 1,53 ^{ab}	16,0 ± 0,00 ^{bc}	0,0 ± 0,00 ^c
CJ 06	14,0 ± 1,00 ^{ab}	16,0 ± 0,00 ^{bc}	9,4 ± 1,15 ^b
CJ 09	15,0 ± 1,00 ^{ab}	15,0 ± 0,00 ^{cd}	9,4 ± 1,53 ^b
CJ 10	13,4 ± 1,53 ^{ab}	15,0 ± 0,00 ^{cd}	9,0 ± 1,00 ^b
CJ 20	12,4 ± 0,58 ^b	14,0 ± 0,00 ^d	0,0 ± 0,00 ^c

* Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente iguais ($p<0,01$).

As amostras de própolis do Baixo São Francisco avaliadas neste trabalho não inibiram as bactérias Gram-negativas *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Tais bactérias parecem ser bastante resistentes a antimicrobianos. Pinto *et al.* (2004), utilizando amostras clínicas, relataram que *Klebsiella pneumoniae* apresentaram resistência aos antibióticos ampicilina, kanamicina e tetraciclina. Neste estudo, utilizando cepas padrão, os controles usados tanto para *K. pneumoniae* (cloranfenicol) como para a *P. aeruginosa* (tetraciclina) demonstraram-se ativos.

A atividade antimicrobiana de própolis foi verificada por Marcucci *et al.* (1996) contra bactérias Gram-negativas sendo *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes sp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. A própolis apresenta eficiente atividade frente a bactérias Gram-positivas e atividade reduzida frente a bactérias Gram-negativas (GRANGE & DAVEY, 1990; BANKOVA *et al.*, 1999 e KUJUMGIEV *et al.*, 1999). Neste estudo é confirmada ação mais efetiva da própolis quanto às cepas de bactérias Gram-positivas e atividade reduzida frente a bactérias Gram-negativas. No entanto, tais resultados não excluem a possibilidade de que em estudos posteriores com amostras dessas localidades os resultados possam ser

modificados, uma vez que a própolis varia sua composição em relação à sazonalidade, tipo de solo, clima, vegetação ou mesmo característica própria de cada colméia (PARK *et al.*, 2002).

3.2.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A análise da concentração inibitória mínima das 10 amostras selecionadas de própolis dos apiários CJ e CP foi realizada frente a *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *B. cereus*. O método utilizado neste estudo foi o de microdiluição em poços conforme preconizado pelo NCCLS (2003).

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.4. As amostras CJ 04, CP 03 e CP 14 apresentaram inibição para todas as seis cepas de bactérias testadas, enquanto as amostras CJ 06, CJ 09, CJ 10, CJ 20, CP 18, CP 19 e CP 29 inibiram o crescimento bacteriano de apenas três a cinco cepas.

A maior inibição foi encontrada para a amostra CP 14 frente a *B. cereus* usando apenas 48,82 µg/mL e para a amostra CP 18 com 48,82 µg/mL contra *S. epidermidis*, *S. aureus* e *B. cereus*. A menor inibição, por outro lado foi apresentada para a amostra CP 18 contra *Escherichia coli* (tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Resultados das CIM (µg/mL) dos 10 extratos de própolis pelo método de microdiluição em caldo.

CEPAS	APIÁRIOS DE COLETA									
	CJ 04	CJ 06	CJ 09	CJ 10	CJ 20	CP 03	CP 14	CP 18	CP 19	CP 29
<i>P.aeruginosa</i>	12.500	12.500	SI	6.250	SI	12.500	3.125	12.500	SI	SI
<i>K.pneumoniae</i>	6.250	6.250	SI	6.250	25.000	3.125	6.250	SI	6.250	SI
<i>E.coli</i>	12.500	SI	SI	SI	SI	12.500	6.250	25.000*	SI	SI
<i>S.epidermidis</i>	97,65	195,31	97,65	390,62	195,31	195,31	97,65	48,82**	195,31	3.125
<i>S.aureus</i>	390,62	97,65	195,31	390,62	195,31	195,31	195,31	48,82**	390,62	781,25
<i>B.cereus</i>	195,31	97,65	97,65	195,31	97,65	195,31	48,82**	48,82**	195,31	781,25

SI – Sem inibição

** – Maior inibição

* – Menor inibição

Os resultados do CIM (tabela 3.4) demonstram que houve inibição em todas as diluições testadas para todas as bactérias Gram-positivas, enquanto para as bactérias Gram-negativas houve uma inibição reduzida, confirmando os resultados já discutidos anteriormente. Vargas *et al.* (2004) sugeriram que uma das razões para esta menor atividade dos extratos de própolis contra bactérias Gram-negativas seria o fato destas

bactérias possuírem parede celular quimicamente mais complexa e um teor lipídico maior, o que poderia explicar sua maior resistência.

Hady e Hegazi (2002), em um estudo envolvendo amostras de própolis coletada no Egito, observaram CIM de 2.400 a 3.200 µg/mL frente a *S. aureus*, e de 1.200 a 2.800 µg/mL frente a *E. coli*. Hegazi *et al.* (2000) testaram a inibição das cepas *S. aureus* e *E. coli* por conta de amostras de própolis provindas da Alemanha e França e obtiveram uma CIM entre 1.000 a 8.400 µg/mL. Dausch (2007) encontrou a menor inibição para *E. coli* em 1.000 µg/mL e para *S. aureus* uma CIM de 125 µg/mL de extrato de própolis vermelha coletada em Alagoas. Neste estudo, as amostras de própolis vermelha do estado de Sergipe demonstraram uma melhor atividade para *S. aureus* por apresentarem uma CIM entre 48,82 a 781,25 µg/mL, enquanto para *E. coli* a atividade foi um pouco reduzida pois apresentou inibição entre 6.250 a 25.000 µg/mL.

Marcucci (1995) encontrou atividade antibacteriana de própolis contra *S. aureus* 209P correspondente a uma CIM de 10.000µg /mL. No trabalho realizado por Lu *et al.* (2005), amostras de própolis de Taiwan apresentaram CIM entre 3,75 a 60 µg/mL contra *S. aureus*. A menor concentração de inibição da própolis vermelha neste estudo foi a da amostra CP 18, que apresentou CIM contra *S. aureus* em 48,82 µg/mL, enquanto a maior CIM foi encontrada na amostra CP 29, apresentando 781,25 µg/mL.

Em seu trabalho, Marcucci (1996) determinou a CIM de extratos de própolis contra *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* dentre outros microrganismos, sendo que de 39 cepas analisadas 25 apresentaram CIM menor que 100 µg/mL. Neste trabalho com a própolis de Sergipe, a CIM para *S. aureus* e *B. cereus* correspondeu à menor concentração testada. É possível que testes futuros usando outras diluições e concentrações menores permitam determinar a CIM destas amostras de própolis com maior precisão frente a estes microrganismos Gram-positivos.

Dausch (2007) comparou três amostras de própolis coletadas na região de Alagoas com antibióticos comerciais frente a *P. aeruginosa* ATCC 13388 e observou que a CIM das três amostras de própolis variaram entre 31 a 500 µg/mL, enquanto que os antibióticos comerciais demonstraram ação na faixa de 1 a 500 µg/mL. Neste estudo os valores de inibição variaram entre 3.125 a 12.500 µg/mL, sendo que três amostras (CJ 09, CP 19 e CP 29) não apresentaram inibição contra *P. aeruginosa* ATCC 1238. É importante ressaltar que Dausch (2007) utilizou cepa diferente da utilizada no presente estudo, isso é relevante uma vez que cada microrganismo possui sua variabilidade genética podendo possuir resistência específica aos antimicrobianos.

Neste estudo o MIC para *S. epidermidis* variou entre 48,82 µg/mL a 3.125 µg/mL. Já a inibição dos extratos de própolis vermelha de Sergipe frente a *K. pneumoniae* ATCC 13883 foi de 3.125 µg/mL a 25.000 µg/mL, sendo que três extratos das dez amostras não apresentaram inibição para esta cepa. Mena *et al*, (2000), obtiveram resultados de inibição para *K. pneumoniae* ATCC 10031 entre 50 a 15.000 µg/mL. Grange & Davey (1990) observaram que os extratos etanólicos de própolis - EEP (3.000 µg de sólidos totais/mL) inibiu completamente *S. epidermidis* ATCC 12228, mas não tiveram efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*.

Os dois testes realizados neste estudo, tanto a difusão em poços como a CIM, são essenciais para obtenção de resultados mais precisos para cada o conhecimento da reação de cada microrganismo. Os testes de diluição permitem obter resultados quantitativos dos valores necessários para inibição de um determinado microrganismo enquanto que, teste de difusão permite analisar o potencial da droga para um valor apenas testado incutido em um disco ou mesmo em poço no ágar.

3.2.2.5. Determinação do teor de Flavonóides, DPPH e de Compostos Fenólicos Totais

O teor de flavonóides, DPPH e ácidos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha foram determinados, e os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Resultados do teor de flavonóides (µg quercetina/g própolis), DPPH* e fenóis totais (mg fenol/g própolis) dos extratos de própolis vermelha.

Extratos	Flavonóides** (%m/m)	Flavonóides (µg/g)	DPPH* *** IC ₅₀ (µg/mL)	Fenólicos totais**** (%m/m)
CJ 06	6,05 ± 0,002	45,39	24,75	2,10 ± 0,045
CJ 04	1,65 ± 0,023	12,38	40,37	1,77 ± 0,040
CP 18	1,00 ± 0,002	7,50	13,26	2,19 ± 0,028
CP 14	0,98 ± 0,019	7,41	13,29	2,27 ± 0,017
CP 19	0,67 ± 0,031	5,05	19,13	2,15 ± 0,046
CJ 10	0,65 ± 0,026	4,92	24,00	2,04 ± 0,057
CP 29	0,59 ± 0,005	4,44	13,57	2,27 ± 0,028
CP 03	0,07 ± 0,044	5,48	33,76	1,35 ± 0,028
CJ 09	0,00 ± 0,000	-	10,58	2,09 ± 0,054
CJ 20	*	-	34,84	1,60 ± 0,039

(-) Não houve resultado devido a falta de amostra (CJ 20) e ausência de flavonóides em (CJ 09). * Não realizou análise desta amostra. ** Valores de referência para Flavonóides – (Baixo: até 1,0; Médio: >1,0 - 2,0; Alto: >2,0) (BRASIL, 2001). *** Valor de Inibição do radical DPPH em 50%. **** Valores de referência para Compostos fenólicos – mínimo de 0,50% (m/m) (BRASIL, 2001).

No que se refere ao teor de flavonóides, 70% das amostras de própolis atendem o valor mínimo de 0,25% (m/m) exigido pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001). As amostras CP 03, CP 19, CP 29, CJ 09 e CJ 10 apresentam baixo teor de flavonóides, enquanto as amostras CP 14, CP 18 e CJ 04 apresentam médio teor de flavonóides e apenas a amostra CJ 06 apresentou alto teor de flavonóides como mostra na tabela 3.5.

De acordo com o Ministério da Agricultura o valor mínimo exigido para compostos fenólicos em extratos de própolis é de 0,50% (m/m) (BRASIL, 2001). Nas amostras estudadas de própolis vermelha de Sergipe, este valor foi percebido em todas as amostras, variando entre 1,35% a 2,27% conforme tabela 3.5. Os valores expressos em (mg fenol equivalentes ao ácido gálico/ g própolis) estão apresentados na tabela 3.6.

O teor de compostos fenólicos totais variou entre 13,52 a 22,78 mg fenol/ g própolis, valores baixos quando comparados a outros estudos. Segundo Dausch (2007), amostras de própolis vermelha apresentaram valores entre 18,1 a 99,7 mg/ g própolis. Odoni (2007) encontrou valores de 37,4 a 231,4 mg/g de fenóis totais em amostra e subfrações de própolis vermelha. Valores entre 22,03 a 39,38 mg/g foram encontrados por Castro *et al.* (2007) em amostra de própolis proveniente de Brumadinho/MG. Trabalho realizado com extrato de própolis verde coletada no estado de São Paulo demonstrou teores de compostos fenólicos iguais a 18,27 mg/g para o extrato fluido e 18,11 mg/g para o extrato seco solubilizado em álcool 50% (FONSECA, 2007).

A própolis e compostos fenólicos incluindo os flavonóides são conhecidos pela capacidade de eliminar radicais livres e pelas propriedades antioxidantas (CHOI *et al.*, 2006). A atividade antioxidante presente na própolis age como ativador na regeneração de tecidos e circulação sanguínea.

Neste estudo os resultados obtidos com as dez amostras de própolis vermelha demonstram que estas possuem atividade antioxidante, capazes de reduzir o radical DPPH[•]. Os resultados das amostras variaram o IC₅₀ de 10,58 a 40,37 µg/mL conforme pode ser observado na tabela 3.5. Fonseca (2007) obteve 70 µg/mL para IC₅₀ de própolis verde proveniente de São Paulo com extrato fluido, 106 µg/mL para extrato hidroalcoólico 50%, 109 µg/mL para extrato solubilizado em álcool etílico 95% e 157 µg/mL em extrato solubilizado em propilenoglicol, valores bastante superiores aos encontrados no presente trabalho, o que evidencia o grande potencial dessas amostras para atividade antioxidante. Moreno *et al.* (2000) evidenciaram que vários extratos etanólicos de própolis argentina (20 µg/mL de princípios solúveis) demonstraram atividade anti-radicais livres baseados na descoloração do radical DPPH[•] (α,α -difenil- β -picrilhidrazil).

As amostras que apresentaram os melhores valores de IC₅₀ foram CJ 09 (10,58 µg/mL), CP 18 (13,26 µg/mL), CP 14 (13,29 µg/mL) e CP 29 (13,57 µg/mL), sendo estas amostras que também apresentaram melhores concentrações de fenóis totais 2,09; 2,19; 2,27 e 2,27% respectivamente. Entretanto, não apresentam melhores teores de flavonóides, sendo que, a amostra CJ 09 que melhor apresentou atividade antioxidante nem apresenta teor de flavonóides (tabela 3.5).

3.2.2.6. Relação entre a atividade antimicrobiana e o teor de flavonóides e de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis.

Os flavonóides formam um grande grupo de compostos polifenólicos encontrados em diversas frutas, vegetais, ou mesmo na própolis (HAVSTEEN, 2002).

Os resultados obtidos das análises de teor de flavonóides encontram-se descritos nas tabelas 4.6 e 4.7. Quando os teores de flavonóides encontrados são comparados com as atividades antimicrobianas dos extratos de própolis vermelha verifica-se que não existe uma relação entre essas duas variáveis para a maioria dos microrganismos testados. Considerando o extrato CP 03, que apresentou os melhores halos de inibição para quatro dos microrganismos testados, este possui apenas 5,48 µg/g de flavonóides (0,07%), sendo este um dos mais baixos teores de flavonóides encontrados dentre os extratos analisados.

Pode-se observar também nas tabelas 4.6 e 4.7 que a amostra CJ 09 não apresenta flavonóides, entretanto, esta amostra possui ação antimicrobiana para todos os microrganismos testados neste estudo, confirmando ainda mais que nem sempre a ação antimicrobiana está relacionada à presença ou mesmo a grande quantidade de flavonóides nas amostras de própolis. O valor mínimo de 0,25% (m/m) exigido pelo ministério da agricultura (BRASIL, 2001) não se justifica, portanto, para qualificar essa variedade de própolis.

No entanto, apenas para as bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 12600 e *S. epidermidis* ATCC 12228, o extrato CJ 06 é a exceção, que obteve o maior teor de flavonóides (45,39 µg/g ou 6,05%) foi também o que apresentou melhor atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos estão de acordo com Daugsch (2007), onde quatro das amostras de própolis vermelha de Alagoas que apresentaram maior atividade antimicrobiana frente *S. aureus* ATCC 25923 foram também as que maior apresentaram teor de flavonóides.

A partir dos dados nas tabelas 3.6 e 3.7 é possível afirmar que não existe relação entre a maior quantidade de fenóis totais apresentarem a melhor atividade antimicrobiana para as amostras usadas neste estudo. Como exemplo, comparando as amostras CP 03 que

apresentou o menor valor de compostos fenólicos totais (13,52 mg/mL) com a amostra CP 29 que apresentou o maior valor de compostos fenólicos totais (22,78 mg/mL) em relação à inibição de todos os microrganismos com exceção da bactéria Gram-positiva *S. aureus*, nota-se que os maiores halos de inibição estão relacionados com o menor valor de fenóis totais (Tabela 3.7).

Tabela 3.6 – Resultados do teor de flavonóides (μg quercetina/g própolis) e fenóis totais (mg fenol equivalente a quercetina/ g própolis) para a bactéria Gram - negativa e os fungos.

Apiário	Flavonóides (% m/m)	Fenóis totais (mg/mL)	Média em diâmetro (mm)		
			<i>E. coli</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>A. nidulans</i>
CP 03	0,07 ± 0,044	13,52 ± 0,285	12,4 ± 0,58 ^a	12,4 ± 0,58 ^a	12,4 ± 1,15 ^a
CP 14	0,98 ± 0,019	22,70 ± 0,174	11,7 ± 0,58 ^{ab}	12,0 ± 1,00 ^a	10,7 ± 0,58 ^{ab}
CP 18	1,00 ± 0,002	21,91 ± 0,282	11,0 ± 0,00 ^{abc}	11,0 ± 1,00 ^{abc}	0,0 ± 0,00 ^c
CP 19	0,67 ± 0,031	21,54 ± 0,465	11,0 ± 1,00 ^{abc}	11,4 ± 1,15 ^{ab}	0,0 ± 0,00 ^c
CP 29	0,59 ± 0,005	22,78 ± 0,282	12,0 ± 0,58 ^{ab}	10,0 ± 0,00 ^{bcd}	10,0 ± 0,00 ^b
CJ 04	1,65 ± 0,023	17,70 ± 0,398	9,0 ± 1,00 ^{de}	0,0 ± 0,00 ^e	0,0 ± 0,00 ^c
CJ 06	6,05 ± 0,002	21,06 ± 0,447	10,4 ± 0,58 ^{bcd}	9,7 ± 0,58 ^{cd}	9,4 ± 1,15 ^b
CJ 09	0,00 ± 0,000	20,92 ± 0,543	9,7 ± 0,58 ^{cde}	9,4 ± 0,58 ^d	9,4 ± 1,53 ^b
CJ 10	0,65 ± 0,026	20,39 ± 0,577	9,0 ± 1,00 ^{de}	9,7 ± 0,58 ^{cd}	9,0 ± 1,00 ^b
CJ 20	*	16,06 ± 0,398	8,4 ± 0,58 ^{ef}	0,0 ± 0,00 ^e	0,0 ± 0,00 ^c

* Não houve amostra para realizar o teste.

** Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente iguais ($p<0,01$).

Tabela 3.7 – Resultados do teor de flavonóides (μg quercetina/g própolis) e Fenóis totais (mg fenol equivalente a quercetina/ g própolis) para a bactéria Gram – positiva.

Apiário	Flavonóides (% m/m)	Fenóis totais (mg/mL)	Média em diâmetro (mm)		
			<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. cereus</i>
CP 03	0,07 ± 0,044	13,52 ± 0,285	11,7 ± 2,89 ^{cdefg}	16,4 ± 0,58 ^a	18,4 ± 0,58 ^a
CP 14	0,98 ± 0,019	22,70 ± 0,174	11,7 ± 1,15 ^{cdefg}	15,7 ± 0,58 ^{ab}	16,7 ± 0,58 ^b
CP 18	1,00 ± 0,002	21,91 ± 0,282	15,4 ± 0,58 ^{abc}	15,0 ± 1,00 ^{ab}	15,7 ± 0,58 ^{bc}
CP 19	0,67 ± 0,031	21,54 ± 0,465	13,4 ± 1,15 ^{abcde}	12,7 ± 1,53 ^b	15,0 ± 0,00 ^{cd}
CP 29	0,59 ± 0,005	22,78 ± 0,282	14,0 ± 1,00 ^{abcd}	15,4 ± 1,53 ^{ab}	16,4 ± 0,58 ^b
CJ 04	1,65 ± 0,023	17,70 ± 0,398	15,4 ± 1,53 ^{abc}	13,7 ± 1,53 ^{ab}	16,0 ± 0,00 ^{bc}
CJ 06	6,05 ± 0,002	21,06 ± 0,447	16,0 ± 0,00 ^{ab}	14,0 ± 1,00 ^{ab}	16,0 ± 0,00 ^{bc}
CJ 09	0,00 ± 0,020	20,92 ± 0,543	17,0 ± 0,00 ^a	15,0 ± 1,00 ^{ab}	15,0 ± 0,00 ^{cd}
CJ 10	0,65 ± 0,026	20,39 ± 0,577	14,4 ± 0,58 ^{abcd}	13,4 ± 1,53 ^{ab}	15,0 ± 0,00 ^{cd}
CJ 20	*	16,06 ± 0,398	12,7 ± 1,15 ^{bcd}	12,4 ± 0,58 ^b	14,0 ± 0,00 ^d

* Não houve amostra para realização do teste;

** Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente iguais ($p<0,01$).

É possível, portanto, que a atividade antimicrobiana conferida às amostras de própolis vermelha deste estudo não esteja sempre associada ao teor de flavonóides como ocorre com outras variedades de própolis. Resultados obtidos por Castro *et al.* (2007) corroboram essa hipótese, demonstrando que algumas variedades de própolis apresentam forte atividade antimicrobiana e não possuem altos teores de flavonóides e fenóis.

As amostras de própolis coletadas estão muito próximas umas das outras dentro de um mesmo apiário. As amostras “CJ”, por exemplo, apresentam uma grande variação na quantidade de flavonóides entre suas amostras, enquanto que as amostras “CP” apresentam valores próximos de teor de flavonóides. Segundo Sforcin *et al.* (2000), a composição química e os efeitos antimicrobianos das própolis dependem do clima e da sazonalidade. Existem ainda outros pontos que podem interferir nesta variação observada nos apiários, desde a composição genética da colônia até a dinâmica de forrageamento das operárias em cada colônia. PARK *et al.* (1998) afirmaram que a variabilidade genética das abelhas pode também influenciar na composição química da própolis. Existindo ainda uma combinação quase infinita de variáveis intervenientes, isso pode fazer com que existam muitas variedades de própolis em um mesmo apiário.

Ao se comparar os resultados da CIM com os teores de flavonóides encontrados nas amostras de própolis vermelha avaliadas, verifica-se que não existe relação entre a quantidade de flavonóides e ação antimicrobiana (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 – Teor mínimo de Flavonóides ($\mu\text{g/mL}$) necessário para a inibição microbiana, baseados nos resultados da CIM para os 10 extratos de própolis analisados.

CEPAS	APIÁRIOS DE COLETA									
	CJ 04	CJ 06	CJ 09	CJ 10	CJ 20	CP 03	CP 14	CP 18	CP 19	CP 29
<i>P. aeruginosa</i>	206,8	756,7	-	40,95	-	9,15	30,88	125,16	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	103,4	378,4	-	40,95	-	2,29	61,76	-	42,17	-
<i>E. coli</i>	206,8	-	-	-	-	9,15	61,76	250,3	-	-
<i>S. epidermidis</i>	1,62	11,82	-	2,56	-	0,15	0,96	0,49	1,32	18,49
<i>S. aureus</i>	6,46	5,91	-	2,55	-	0,15	1,93	0,49	2,64	4,62
<i>B. cereus</i>	3,23	5,91	-	1,28	-	0,15	0,48	0,49	1,32	4,62

(-) Não foi realizado análise de flavonóides destas amostras.

Tomando por base a cepa *P. aeruginosa*, verifica-se que as amostras que apresentaram concentração inibitória mínima de 12.500 $\mu\text{g/mL}$ (CJ 04, CJ 06, CP 03 e CP 18) tabela 3.4, apresentavam valores muito variáveis para o teor de flavonóides tabela 3.8. Resultado semelhante foi observado para os demais microrganismos usados neste estudo.

Este resultado reforça o que já tinha sido observado quando do teste de sensibilidade antimicrobiana, pois mesmo usando a menor ou a maior quantidade de flavonóides frente a estes microrganismos citados a inibição foi similar, logo, a quantidade de flavonóides não foi o fator determinante para a inibição. É importante ressaltar os resultados de CIM para a amostra CP 18 frente a *S. epidermidis*, *S. aureus* e *B. cereus*, e o resultado da amostra CP 14 para *B. cereus* em que foram necessários apenas 48,82 µg/mL de extrato de própolis vermelha para inibição do crescimento destes microrganismos, apesar destes mesmos extratos estarem classificados dentre os menores teores de flavonóides encontrados neste estudo.

3.3. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste estudo pode-se concluir que:

- 1) Dentre as 25 amostras de própolis dos apiários visitados neste estudo, 9 apresentaram rendimento acima do valor preconizado pelo Ministério da Agricultura;
- 2) Dentre as 25 amostras de própolis coletadas, 92% apresentaram atividade frente à *Staphylococcus aureus*, 72% frente à *Escherichia coli* e 44% para *Candida parapsilosis*;
- 3) Houve uma relação direta entre a cor da própolis e sua atividade antimicrobiana para *S. aureus*. Dentre todos os microrganismos testados neste estudo, as amostras de própolis vermelha demonstraram inibição para todas as bactérias Gram-positivas enquanto para as bactérias Gram-negativas houve uma inibição reduzida;
- 4) Quando comparados os resultados de atividade antimicrobiana das própolis frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*, verifica-se que a bactéria Gram-positiva *S. aureus* demonstra maior sensibilidade frente os extratos testados;
- 5) Para o teste realizado com *C. parapsilosis*, em torno de 56% das amostras de própolis não apresentaram ação antifúngica para esta cepa, sendo que as 44% que apresentaram formação de halos de inibição eram da cor vermelha;
- 6) No que se refere ao teor de flavonóides, 70% das amostras de própolis atendem o valor mínimo de 0,25% (m/m) exigido pelo Ministério da Agricultura. No entanto, não houve relação entre atividade antimicrobiana e teor de flavonóides encontrado;
- 7) Todas as 10 amostras estudadas de própolis vermelha de Sergipe apresentaram teores de compostos fenólicos superiores aos determinados pelo Ministério da Agricultura, mas abaixo de alguns da média observada na literatura. Os dados obtidos evidenciaram que não existe relação entre a maior quantidade de fenóis totais e o nível de atividade antimicrobiana para as amostras usadas neste estudo.
- 8) Os resultados obtidos com as dez amostras de própolis vermelha demonstram que possuem atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o radical DPPH[•].

3.4. REFERENCIAS

- ADELMAN, J. **Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, PR, 2005.
- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de Fitoterápicos [on line]. Disponível na internet via WWW url: http://sbqensino.foco.fae.ufmg.br/caderno_quimica_de_farmacos. Arquivo capturado em 04 de Janeiro de 2009.
- ANA – Agencia Nacional de Águas. Os Novos Limites da Bacia do São Francisco. Disponível na internet via url: <http://www.ana.gov.br/gefsfOld/Projeto/baciaNovosLimites.asp>. Consultado em 05 de janeiro de 2009.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o controle de Infecção em Serviços de Saúde.** Disponível na internet via url: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaudade/manuais/microbiologia.asp>. Consultado em: 10 de Março de 2008.
- ARAUJO, E.D. *Relatório Final de projeto de Pesquisa: Adequação tecnológica para a produção de pólen como instrumento de geração de renda familiar para apicultores de comunidades do Baixo São Francisco*, Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe - FAPITEC/SE, 28p, 2008.
- BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S, MARCUCCI MC, TSVETKOVA I, KUJUMGIEV A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70, p.190-193, 1999.
- BANKOVA, Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, p.114-117, 2005.
- BANKOVA, , CASTRO, S.L.D. e MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, p.3-15, 2000.
- BANKOVA, ; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z Naturforsch C*, 50(3-4), p.167–172, 1995.
- BARRETO, A.L.S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos** – Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes, UNIT, Aracaju/SE, 2008.
- BITTENCOURT, F.O. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha**, Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes, UNIT, Aracaju/SE, 2008.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26(4617), p. 1199-1200, 1958.
- 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, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Publicado no Diário Oficial da União de 23/01/2001, Seção 1 , Página 18.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, p. 347-363, 1998.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e Nordeste do Brasil: influencia da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, 30(7), p.1512-1516, 2007.

DAUSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do brasil e suas características químicas e biológicas.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP/SP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

FONSECA, Y.M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, USP-RP, Brasil, 2007.

FUNARI, C.S.; FERRO, O. Análise de própolis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(1), p171-178, 2006.

GRANGE J.M, DAVEY, R.W. Antibacterial properties of própolis (bee glue). *J R Soc Med*, 83, p.159-160, 1990.

HADY, F. K. A. E & HEGAZI, A. G. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. *Z. Naturforsch.* 57(c), p.386-394, 2002.

HAVSTEEEN, B., H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96, p.67-202, 2002.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharma*, 55, p. 423–430; 2005.

KUJUMGIEV A, TSVETKOVA I, SERKEDJIEVA Y, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 64(3), p.235-240, 1999.

LEE , K.W.; kim, Y.J.; LEE, H.J.; LEE, C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chemical.* 51, p.7292-7295, 2003.

LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FRANCO, S.L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(3), p. 388-395; 2007.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19, p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, p.26, p.83-99, 1995.

MENEZES, H., JR, M. B., OLIOVEIRA, S. D. E PAGNOCCA, F. C. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. *Apidologie*, 28(2), p. 71-76,1997.

METZNER, J., SCHNEIDEWIND, E. M. e FRIEDERICH, E. Effect of propolis and pinocembrin on fungi. *Pharmazie*, 32, p. 730-732, 1977.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(2), p.247-256, 2000.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved Standard—Eighth. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.

ODONI, T. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie Apis mellifera**, Dissertação de mestrado, Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, São Paulo, SP, Brasil, 2007.

ORLANDO, S.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Barbatimão)**. 89f, Dissertação de Mestrado (Mestrado em Promoção da Saúde), Universidade de Franca, Franca, SP, Brasil, 2005.

PARK, Y. K., KOO, M. H., IKEGAKI, M. E CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de biologia e tecnologia*, 40, p.97-106, 1997.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*, 50, p.2502–2506, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18(3), p.313-318, 1998.

PEPELJNJAK S, JALSENJAK I, MAYSINGER D. Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts. *Pharmazie*. 37, p.864–865, 1982.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detection of *Listeria*, *Salmonella* and *Klebsiella* in a hospital food service. *Re Nutr.*, 17(3), p.319-326, 2004.

PROCTOR, M., YEO, P., LACK, A. **The natural history of pollination**. London: Harper Collins Publishers. 1996.

SAWAYA, A.C.H.F., PALMA, A.M., CAETANO, F.M., MARCUCCI, M.C., CUNHA, I.B.S., ARAUJO, C.E.P. e SHIMIZU, M.T. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Letters in applied microbiology*, 35, p. 205-207, 2002.

SFORCIN, J.M, FERNANDES J.R.A, LOPES, C.A.M., BANKOVA, , FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*, 73, p.243-249, 2000.

SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: *WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE*, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: American Society of Agricultural Engineers. p.393-396, 2006.

SIQUEIRA, A.L. **Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre Enterococcus faecalis** – Dissertação de mestrado, Aracaju: UNIT, 2008.

SOARES,A.K.A.; CARMO,G.C.; QUENTAL,D.P.; NASCIMENTO,D.F.; BEZERRA,F.A.F.; MORAES,M.O.; MORAES,M.E.A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. *Rev Bras Farmacogn.* 16, p. 447-454. 2006.

VARGAS, A.C. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico e própolis. *Ciência Rural*, 34(1); p.159-163; 2004.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey, USA: Prentice Hall, 1999.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL

4. CONCLUSÃO GERAL

Através deste estudo foi possível verificar que as amostras de própolis coletadas na região da foz do rio São Francisco possuem propriedades biológicas importantes, especialmente nas variedades de coloração vermelha. O capítulo II serviu como base metodológica para as análises subsequentes, enquanto o capítulo III, mais detalhado, abordou os resultados obtidos da análise prospectiva das variedades de própolis provenientes de cinco apiários da Região, tomando por base a atividade antimicrobiana frente a três microrganismos patogênicos bastante utilizados em análises antimicrobianas de diversas variedades de própolis. Esse screening inicial permitiu selecionar 10 amostras de própolis vermelha que foram analisadas de forma pormenorizada, envolvendo tanto a análise de atividade antimicrobiana em testes quantitativos e qualitativos frente a 6 outros microrganismos, entre fungos e bactérias. Além disso, esse capítulo envolveu a avaliação dos teores de flavonóides, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante por meio da técnica DPPH.

Com o objetivo de determinar qual metodologia de extração seguir, uma vez que existem vários métodos de extração descritos na literatura, foram comparados quatro métodos de extração: banho-maria, soxhlet, maceração e ultra-som, em diferentes períodos de tempo utilizando como matéria prima uma amostra de própolis vermelha. O rendimento das extrações variou de 9,42% (ultra-som por 1h) a 28,14% (banho-maria por 4h). Ao testar os extratos de própolis vermelha obtidos com estes métodos, foram percebidas algumas propriedades no método de extração em ultra-som 1 hora, que levaram à determinação desse método como o mais indicado em função das características do estudo e de suas finalidades, especialmente por ser um método mais rápido, maior potencial de geração de publicações e por ter apresentado os melhores resultados quanto à atividade antimicrobiana para *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Escherichia coli* ATCC 700790 e *Candida guilliermondii* ATCC 6260, mesmo não sendo o extrato com o maior rendimento.

Com a metodologia de extração escolhida, trabalhou-se com 25 amostras de própolis coletada na região da Foz do rio São Francisco, sendo cinco amostras de cada apiário visitado (CJ, CP, FE, PG e PE). Dentre estas, 09 amostras demonstraram estar dentro da faixa de rendimento determinado pelo Ministério da Agricultura, que é de 11% para extrato seco de própolis. As amostras foram testadas inicialmente frente a três microrganismos onde 92% apresentaram atividade frente a *Staphylococcus aureus*, 72% frente a *Escherichia coli* e 44% frente a *Candida parapsilosis*. Foi possível observar que houve uma relação direta entre a cor da própolis e sua atividade antimicrobiana para *S. aureus*, uma vez que todos os halos de inibição superiores a 11 mm para esse microrganismo foram obtidos a

partir de amostras de própolis vermelhas. Após o screening das amostras quanto ao perfil antimicrobiano, 10 amostras foram selecionadas para realização dos demais testes.

As 10 amostras selecionadas apresentavam coloração vermelha, variando entre vermelho claro a vermelho intenso. As amostras foram dos apiários CJ e CP. Todas foram testadas frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* isolada em alimentos, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1238, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, e *Aspergillus nidulans* INCQS 40022. As 10 amostras de própolis vermelha demonstraram inibição para todas as bactérias Gram-positivas, e 6 amostras apresentaram atividade para o fungo, enquanto para as bactérias Gram-negativas houve uma inibição antimicrobiana reduzida.

Ao analisar o teor de flavonóides destas amostras, 70% atendem o valor mínimo de 0,25% (m/m) exigido pelo ministério da agricultura. No entanto, não houve relação entre atividade antimicrobiana e teor de flavonóides. Esses resultados geram o questionamento sobre o significado efetivo do valor mínimo de 0,25% (m/m) exigido pelo Ministério para amostras de própolis. Talvez esses valores sejam adequados para a classificação de outras variedades de própolis, mas demonstra ser inadequado para as própolis vermelhas testadas nesse estudo. Na análise de compostos fenólicos totais todas as amostras apresentaram-se dentro da faixa preconizada pelo Ministério da Agricultura que é de 0,50% (m/m), porém abaixo de algumas médias observadas na literatura. Entretanto, nesse caso também é possível afirmar que não existe relação entre a maior quantidade de fenóis totais e o nível de atividade antimicrobiana para as amostras usadas neste estudo. Os resultados obtidos com as dez amostras de própolis vermelha foram bastante variáveis, mas demonstraram possuir atividade antioxidante, sendo capazes de reduzir o radical DPPH^{*}, sendo que algumas amostras apresentaram grande potencial antioxidante quando comparadas a outras variedades de própolis descritas na literatura.

Estas conclusões nos revelam que, amostras de própolis de coloração vermelha encontrada principalmente na região litorânea brasileira possuem propriedades biológicas importantes e que podem ser usadas futuramente na produção de fármacos para uso na sociedade. Vale ressaltar ainda que, estudos mais refinados poderão ser desenvolvidos, como o de cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia em camada delgada, e auxiliar na identificação dos compostos químicos presentes nestas amostras encontradas no litoral norte de Sergipe. Testes mais precisos para analisar a atividade antioxidante destas amostras como a peroxidação lipídica e a quimioluminescência poderão reforçar os resultados obtidos quanto à importância biológica dessas amostras da região do Baixo São Francisco.

Os resultados obtidos nesse estudo apontam para a viabilidade de investimentos em produção de própolis vermelha nesta região. Esforços nesse sentido poderão favorecer o desenvolvimento sócio-econômico da foz do rio São Francisco por meio de uma atividade geradora de renda, conservadora do meio ambiente, com grande potencial de agregação de valores, além de seguir a aptidão da região pela atividade de Apicultura, que atualmente encontra-se em pleno desenvolvimento.